

**STAPHYLOKOKKEN-ENTEROTOXIN E
— NACHWEIS MITTELS ELISA
SOWIE REINIGUNG MIT HILFE
AFFINITÄTSGEREINIGTER ANTIKÖRPER**

Roland Jung

Disbui. München

1987



AUS DEM INSTITUT FÜR HYGIENE UND TECHNOLOGIE
DER LEBENSMITTEL TIERISCHEN URSPRUNGS
(LEHRSTUHL: PROF. DR. G. TERPLAN)
DER TIERÄRZTLICHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

STAPHYLOKOKKEN-ENTEROTOXIN E
- NACHWEIS MITTELS ELISA SOWIE REINIGUNG MIT HILFE
AFFINITÄTSGEREINIGTER ANTIKÖRPER

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER TIERMEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE
DER TIERÄRZTLICHEN FAKULTÄT
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

VON

ROLAND JUNG

AUS

HERRENBERG

MÜNCHEN 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

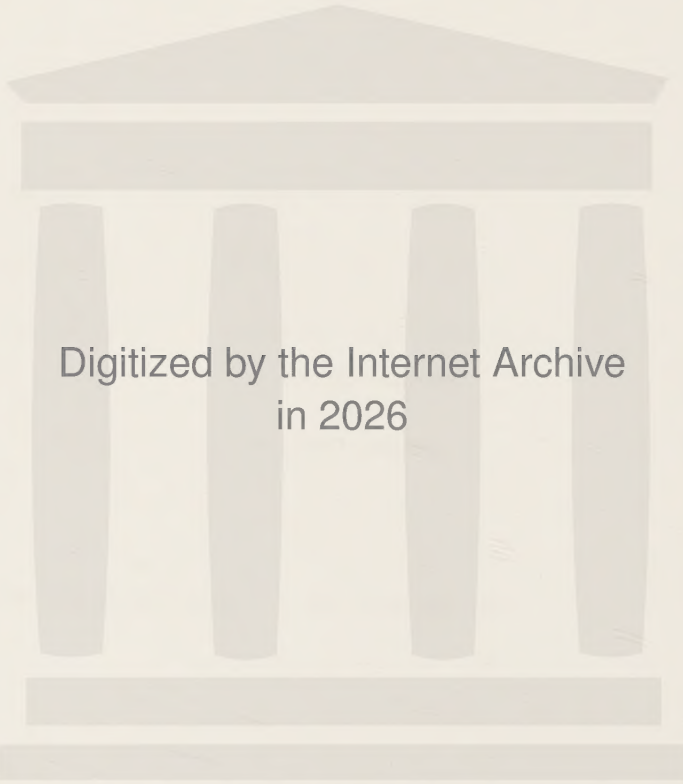
Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse
Referent: Prof. Dr. G. Terplan
Korreferent Prof. Dr. H.G. Buschmann

Tag der Promotion: 26. Februar 1988



drucken + binden
gmbh
Schellingstraße 23
8000 München 40
☎ 089/28 44 45

Meinen Eltern
und
meiner Frau



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 EINLEITUNG	1
2 SCHRIFTTUM	2
2.1 Staphylokokken-Enterotoxin E	2
2.1.1 Allgemeines	2
2.1.2 Produktion und Reinigung	3
2.1.3 Physikalisch-chemische Eigenschaften	6
2.1.4 Antigene Eigenschaften	9
2.1.5 Toxische Eigenschaften	13
2.2 Affinitätschromatographie als hochwirksame Trennmethode	14
2.2.1 Allgemeines	14
2.2.2 Immunaффinitätschromatographie	18
2.2.2.1 Allgemeines	18
2.2.2.2 Isolierung von Staphylokokken-Entero- toxinen (SE)	21
2.2.2.3 Präparation von anti-SE-Serum	22
3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN	25
3.1 Immunisierungsversuche mit SEE	25
3.1.1 Material	25
3.1.2 Methodik	26
3.1.2.1 Immunisierung	26
3.1.2.2 Bestimmung des Antikörpertiters	26
3.1.3 Ergebnisse	27
3.2 Charakterisierung des Antiserums mittels Immunelektrophorese nach GRABAR und WILLIAMS (1953)	27
3.2.1 Material	27
3.2.2 Methodik	29

3.2.3	Ergebnisse	29
3.3	Affinitätschromatographische Absorption des anti-SEE-Serums an SEA-Sepharose	31
3.3.1	Material	31
3.3.2	Methodik	32
3.3.3	Ergebnisse	34
3.4	Isolierung von anti-SEE-Schaf-IgG	37
3.4.1	Material	37
3.4.2	Methodik	37
3.4.3	Ergebnisse	38
3.5	Enzymmarkierung von anti-SEE-Schaf-IgG und SEE/A-Antikörpern	39
3.5.1	Material	39
3.5.2	Methodik	43
3.5.3	Ergebnisse	45
3.6	Erstellung eines Sandwich-ELISA zum spezifischen Nachweis von SEE	45
3.6.1	Material	45
3.6.2	Herstellung des Immunosorbens	48
3.6.2.1	Methodik	48
3.6.2.2	Ergebnisse	49
3.6.3	Optimierung der Enzymbestimmung	49
3.6.3.1	Methodik	49
3.6.3.2	Ergebnisse	51
3.6.4	Prüfung dreier Sandwich-ELISA-Varianten auf ihre Eignung für den spezifischen Nachweis von SEE	53
3.6.4.1	Material	53
3.6.4.2	Methodik	53
3.6.4.3	Ergebnisse	59
3.6.5	Standardisierung der am besten geeigneten Variante	63
3.6.5.1	Methodik	63
3.6.5.2	Ergebnisse	64

3.7	Affinitätschromatographische Reinigung von SEE	64
3.7.1	Produktion von SEE	64
3.7.1.1	Material	64
3.7.1.2	Methodik	64
3.7.1.3	Ergebnisse	66
3.7.2	Isolierung von SEE aus Kulturüberstand durch Adsorption an SEE/A-Antikörper-Sephrose	66
3.7.2.1	Material	66
3.7.2.2	Methodik	66
3.7.2.3	Ergebnisse	67
3.7.3	Isolierung von SEE aus anderen Medien	69
3.7.3.1	Material und Methodik	69
3.7.3.2	Ergebnisse	69
3.7.4	SDS-Gelelektrophorese von affinitäts- gereinigtem SEE	71
3.7.4.1	Material	71
3.7.4.2	Methodik	71
3.7.4.3	Ergebnisse	75
3.7.5	Isoelektrische Fokussierung von affinitäts- gereinigtem SEE	75
3.7.5.1	Material	75
3.7.5.2	Methodik	76
3.7.5.3	Ergebnisse	76
3.7.6	Gelfiltration von affinitätsgereinigtem SEE an Sephadex G-50	78
3.7.6.1	Material und Methodik	78
3.7.6.2	Ergebnisse	78
4	DISKUSSION	80
5	ZUSAMMENFASSUNG	93
	SUMMARY	95
6	LITERATUR	97

1 EINLEITUNG

Staphylokokken-Intoxikationen, die zu den häufigsten mikrobiell bedingten Lebensmittelvergiftungen zählen, werden durch hitzestabile Proteine, die Staphylokokken-Enterotoxine (SE), verursacht. Der Nachweis dieser Toxine wird fast ausschließlich mit Hilfe serologischer Methoden geführt. Da die Geldiffusionsmethoden sich als nicht ausreichend zum Schnellnachweis Lebensmittelvergiftungen auslösender Konzentrationen erwiesen, wurde nach empfindlicheren Verfahren gesucht, wobei SIMON und TERPLAN (1977) an diesem Institut ein enzymimmunologisches Verfahren entwickelten. Zuverlässigkeit und Spezifität des Nachweises sind für die einzelnen SE-Typen unterschiedlich und speziell bei enzymimmunologischen Verfahren von der Qualität der verfügbaren Antiseren abhängig. Die Reinigung der zum Teil in relativ geringen Mengen gebildeten SE ist sehr aufwendig und nicht immer ganz befriedigend. Das Vorkommen gemeinsamer Antigendeterminanten auf SE führt zu Kreuzreaktionen mit heterologen Antiseren und erschwert den spezifischen Nachweis bei hochempfindlichen Verfahren zusätzlich.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein empfindliches enzymimmunologisches Verfahren nach dem Sandwich-Prinzip für den spezifischen Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin E (SEE) entwickelt werden. Bei diesem SE sind gemeinsame Epitope mit SEA bekannt. Dies ist vermutlich mit ein Grund, daß bei kommerziell verfügbaren Tests SEE noch nicht einbezogen wurde. Bei der Aufbereitung des Antiserums wurde eine Immunaффinitätschromatographie zur Isolierung einer Antikörperfraktion mit definierter Spezifität durchgeführt. Die Einsatzmöglichkeiten dieser Antikörperfraktion wurden sowohl bei der Erstellung eines Sandwich-ELISA für den spezifischen SEE-Nachweis als auch bei der affinitätschromatographischen Reinigung von SEE geprüft.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Staphylokokken-Enterotoxin E

2.1.1 Allgemeines

Staphylokokken-Enterotoxine (SE) werden von etwa 50 % (NOTERMANS et al., 1984a) der koagulase- und thermonukleasepositiven Staphylokokken produziert. Vereinzelt (LACHICA et al., 1969; LOTTER und GENIGEORGIS, 1975; MAYER, 1975 u.a.) wurde berichtet, daß auch koagulasenegative Staphylokokken enterotoxinogen sein können. Nach LOTTER und GENIGEORGIS (1977) ist aber davon auszugehen, daß dies stets Varianten oder Mutanten von *Staphylococcus* (S.) *aureus*-Stämmen waren. Die SE lassen sich aufgrund unterschiedlicher antigener Eigenschaften in mehrere Typen einteilen, die alphabetisch benannt wurden. Es konnten bisher fünf Haupttypen SEA bis SEE isoliert werden; SEC wurde in die Untertypen C₁, C₂ und C₃ untergliedert, die sehr geringe Unterschiede in der Antigenstruktur aufweisen (LEE et al., 1980; THOMPSON et al., 1984). Ein von BERGDOLL et al. (1981) als SEF beschriebenes Staphylokokken-Exoprotein konnte in seinen Eigenschaften nicht als SE bestätigt werden (REISER et al., 1983; IGARASHI et al., 1984) und wurde in "Toxic Shock Syndrome Toxin One - TSST-1" (BERGDOLL und SCHLIEVERT, 1984) umbenannt.

Von BERGDOLL et al. (1971) wurde das von S. aureus FRI 326 (Food Research Institute) produzierte SE, das nicht mit spezifischen Antikörpern gegen die Typen A bis D reagierte, als SEE bezeichnet. Dieser Stamm war vom Chicago Health Department aus einem Hühnerfleischfertiggericht (BERGDOLL, 1987) isoliert worden, das 1960 Ursache einer Lebensmittelvergiftung gewesen war. SEE-bildende S. aureus-Stämme wurden sowohl bei Untersuchungen im Zusammenhang mit Lebensmittelvergiftungen (GILBERT, 1974; YAMADA, 1977b; WINDYGA, 1978; SOUREK, 1980; RAJALAKSHMI und RAJYALAKSHMI, 1982) als auch bei routinemäßigen Prüfungen von Lebensmitteln und Mastitiskreten isoliert (PAYNE und WOOD, 1974; MAYER, 1975; OTHMAN

und MAY 1981; RICHTER et al., 1981; LIM et al., 1982; VARADARAJ und NAMBU DRIPAD, 1982; ADESIYUN, 1984). In Nasenabstrichen gesunder Menschen konnten SEE-bildende *S. aureus*-Stämme ebenso nachgewiesen werden (POLLEDO et al., 1985; ADESIYUN et al., 1986) wie in klinischem Material vom Menschen (MÜLLER et al., 1973; WIENECKE, 1974; MAYER, 1975; PETRÁŠ und MAŠKOVA, 1980; OSVÁTH-MARTON et al., 1981; MOCHMANN et al., 1981; RAŠKA et al., 1981; LIM et al., 1982; PALASUNTHERAM und BEAUCHAMP, 1982; PETRÁŠ und MAŠKOVA, 1982; MAUFF et al., 1983). Dabei war SEE z.T. auch mit anderen SE-Typen vergesellschaftet. Insgesamt wurden SEE-bildende *S. aureus*-Stämme allerdings vergleichsweise selten registriert. In diesem Zusammenhang ist auch die Beobachtung von NOTERMANS et al. (1983) von Interesse. Diese Autoren fanden nur bei 20 % der von ihnen untersuchten Humanserena gesunder Individuen Antikörper gegen SEE, während sich die Anteile für die anderen vier SE-Typen auf das Doppelte (SED) bis Vierfache (SEB) beliefen. Der Nachweis von SEE wurde im übrigen von allen oben genannten Autoren mit Hilfe des Geldiffusionstests geführt. Allein NOTERMANS et al. (1983) bedienten sich beim Nachweis der Antikörper gegen SEE eines Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

2.1.2 Produktion und Reinigung

Die Synthese von SEE scheint, wie die von SEA und SED, chromosomal codiert zu sein (BERGDOLL et al., 1974a), der Ort der Synthese ist noch unbekannt. Im Hinblick auf das Enterotoxinbildungsvermögen verhalten sich SEE-Bildner ähnlich wie SEA- und SED-Bildner (ROBBINS et al., 1974). Wie aus Übersicht 1 hervorgeht, steht der unter optimalen Voraussetzungen erzielbare Ertrag an SEE erheblich hinter dem an SEB und SEC₁ zurück.

Für die Produktion von reinen SE werden fast ausschließlich flüssige Nährmedien verwendet, weil der dabei mögliche Einsatz großer Nährmedien-Volumina einen größeren SE-Ertrag pro Ansatz liefert. Dabei ist es sinnvoll, Medien aus nieder-



Übersicht 1: Enterotoxinproduktion mittels verschiedener Verfahren (nach ROBBINS et al., 1974)

SE-Typ (S. aureus- Stamm-Nr.)	SE-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)			
	Schüttel- kultur	halbfestes Medium	Zellophan- membran- Technik ^{x)}	"sac-cul- ture"- Verfahren
A (100)	2,6	4	19	14
B (901)	26,0	11	15	100
C ₁ (137)	72,0	20	143	360
D (471)	0,5	1-2	4	4
E (326)	4,1	10	16	16

^{x)} mit ca. 1 Jahr alter Membran erzielte Werte

molekularen Substanzen (Proteinhydrolysate) zu verwenden, um die Reinigung nicht unnötig durch aus dem Medium stammende Substanzen zu erschweren. So wurden bei der Produktion von SEE in Schüttelkulturen überwiegend mit Niacin und Thiamin versetzte Medien aus 3 % Protein Hydrolysate Powder (PHP) und 3 % NZ-Amine NAK (BERGDOLL et al., 1971; BORJA et al., 1972; SHINAGAWA et al., 1977; KARSCH und RICHTER, 1979; ODA, 1980), bzw. aus 4 % NZ-Amine NAK (TERAYAMA et al., 1974; YAMADA, 1977a) eingesetzt. NOTERMANS et al. (1983) verwendeten dagegen Hirn-Herz-Bouillon (BHI) und bedienten sich des "sac-culture"-Verfahrens nach DONNELLY et al. (1967). Hierbei erfolgt die SEE-Produktion in einem Puffer mit niedermolekularen, aus der BHI stammenden Nährstoffen, da die von BERGDOLL (1979) empfohlenen, das Medium enthaltenden Visking Dialysierschläuche bei einem Porendurchmesser von 1,5-2 nm nur Moleküle mit einer Molekülmasse kleiner 15.000 Dalton (D) durchlassen. Von den oben genannten Autoren wurden die Medien 2-3 Tage bei 37 °C inkubiert, auch wenn nach THOMAS et al. (1973) eine Temperatur von 40 °C optimal sein

Übersicht 2: Verschiedene Verfahren zur Reinigung von SEE

Reinigungs- schritt	Reinigungsverfahren nach						
	BORJA et al., (1972)	TERAYAMA et al., (1974)	SHINAGAWA et al., (1977)	YAMADA (1977a)	KARSCH und RICHTER (1979)	ODA (1980)	NOTERMANS et al. (1983)
1	Ionenau- tauschchroma- tographie (CM-Cellulose)	Ionenau- tauschchroma- tographie (Amberlite CG-50)	Ionenau- tauschchroma- tographie (CM-Sephadex C-25)	Ionenau- tauschchroma- tographie (Amberlite CG-50)	Ionenau- tauschchroma- tographie (CM-Cellulose)	Ionenau- tauschchroma- tographie (SP-Sephadex C-25)	Ionenau- tauschchroma- tographie (CM-Sephadex C-25)
2	Gelfiltration (Sephadex G-75 superfine)	Ionenau- tauschchroma- tographie (CM-Cellulose)	Ionenau- tauschchroma- tographie (DEAE-Sepha- dex A-25)	Ionenau- tauschchroma- tographie (CM-Cellulose)	Ionenau- tauschchroma- tographie (CM-Cellulose)	Gelfiltration (Sephadex G-75 superfine)	Gelfiltration (Sephadex G-100)
3	Gelfiltration (Sephadex G-75 superfine)	Ionenau- tauschchroma- tographie (DEAE- Cellulose)	Gelfiltration (Sephadex G- 100 superfine)	Ionenau- tauschchroma- tographie (DEAE- Cellulose)	Gelfiltration (Sephadex G-100)		Isoelektrische Fokussierung
4	Gelfiltration (Sephadex G-75 superfine mit 6 mol/l Harn- stoff)	Ionenau- tauschchroma- tographie (DEAE- Cellulose)	Gelfiltration (Sephadex G- 100 superfine)	Ionenau- tauschchroma- tographie (DEAE- Cellulose)	Isoelektrische Fokussierung		
5		Gelfiltration (Sephadex G-75)		Gelfiltration (Sephadex G-75)	Gelfiltration (Sephadex G-100)		

soll. Die angewandten Reinigungsverfahren sind entweder eigens für SEE entwickelt (BORJA et al., 1972; TERAYAMA et al., 1974; SHINAGAWA et al., 1977) oder für mehrere (YAMADA, 1977a; ODA, 1980) bzw. alle bekannten SE-Typen (KARSCH und RICHTER, 1979; NOTERMANS et al., 1983) eingesetzt worden. Aus Übersicht 2 geht hervor, daß die meisten Verfahren auf einer Kombination von Ionenaustauschchromatographie (Amberlite, CM- bzw. DEAE-Cellulose, DEAE-, CM- bzw. SP-Sephadex) und Gelfiltration (Sephadex G-75 bzw. G-100) beruhten. In zwei Fällen wurde zudem eine präparative isoelektrische Fokussierung (IEF) durchgeführt (KARSCH und RICHTER, 1979; NOTERMANS et al., 1983). Angaben über die Ausbeute im Endprodukt bezogen auf die ursprünglich im Kulturüberstand vorhandene Menge finden sich nur bei YAMADA (1977a) und bei ODA (1980), die 3 % bzw. 36 % angeben. BORJA et al. (1972) hatten nach dem zweiten von vier Reinigungsschritten eine Wiedergewinnungsrate von 25 % registriert.

2.1.3 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Die Arbeit von BORJA et al. (1972) enthält die einzige umfassende Charakterisierung von SEE. Danach handelt es sich bei gereinigtem, lyophilisiertem SEE um eine flaumige weiße Substanz, die in wäßrigen Salzlösungen sehr gut löslich ist. Das Molekulargewicht beträgt ca. 29.600 D. Das Toxinmolekül ist ein einfach gebautes Protein, das aus einer einzelnen Polypeptidkette mit 259 Aminosäureresten besteht. Als N-terminale Aminosäure wurde Serin, als C-terminale Threonin identifiziert. Ein Vergleich der Aminosäurezusammensetzung mit jener der anderen SE (Übersicht 3) läßt eine Ähnlichkeit mit SEA und, nicht ganz so ausgeprägt, mit SED erkennen. Unterschiede gegenüber SEB, SEC₁, SEC₂ und SEC₃, die ihrerseits untereinander ähnlich sind, zeigen sich in einem niedrigeren Lysin-, Asparaginsäure-, und Methioningehalt sowie in einem höheren Anteil an Arginin, Glutaminsäure und Leucin. Es ist nicht bekannt, ob der Aminosäurezusammensetzung eine Bedeutung, über ihre mögliche Rolle bei der Anti-

Übersicht 3: Aminosäurezusammensetzung der Enterotoxine (in Gramm/100 Gramm Protein)

Aminosäure	SEA ^{a)}	SEB ^{b)}	SEC ^{c)} ₁	SEC ^{d)} ₂	SEC ^{e)} ₃	SED ^{g)}	SEE ^{h)}
Lysin	11,26	14,85	14,43	13,99	13,73	12,93	10,83
Histidin	3,16	2,34	2,91	2,87	2,96	2,66	3,04
Arginin	4,02	2,69	1,7	1,75	1,62	3,38	4,50
Asparaginsäure	15,53	18,13	17,85	18,39	18,27	16,67	15,10
Threonin	5,96	4,50	5,31	5,80	6,07	4,51	6,36
Serin	2,99	4,05	4,58	4,81	5,64	5,09	4,72
Glutaminsäure	12,36	9,45	8,95	8,93	7,86	13,15	12,13
Prolin	1,35	2,11	2,16	2,23	2,30	1,41	1,93
Glycin	2,96	1,78	2,99	2,90	3,34	2,69	4,10
Alanin	1,94	1,32	1,85	1,61	1,74	2,00	2,38
Halb-Cystin	0,66	0,68	0,79	0,74	0,62	0,74	0,81
Valin	4,93	5,66	6,50	5,87	5,63	4,13	4,36
Methionin	0,96	3,52	3,20	3,60	3,72	1,07	0,45
Isoleucin	4,11	3,53	4,09	4,02	3,38	6,00	4,30
Leucin	9,78	6,86	6,54	6,13	6,58	9,25	10,08
Tyrosin	10,63	11,50	9,80	10,27	10,34	7,23	9,79
Phenylalanin	4,31	6,23	5,35	5,25	5,40	4,76	4,47
Tryptophan	1,46	0,95	0,99	0,84	1,51	0,62	1,51
Amid-NH ₂	1,80	1,66	1,71	1,62	1,12	1,71	1,66

a) nach SCHANTZ et al. (1972); b) nach BERGDOLL et al. (1965); c) d) nach HUANG et al. (1967);
e) nach BERGDOLL (1983); f) nach REISER et al. (1984); g) nach CHANG und BERGDOLL (1979);
h) nach BORJA et al. (1972)

genstruktur hinaus, zukommt (BERGDOLL, 1983).

Das Absorptionsmaximum von gereinigtem SEE bei 277 nm erlaubt eine quantitative Bestimmung von SEE mit Hilfe eines Extinktionskoeffizienten E (1 %; 1 cm): 12,5. Charakteristisch für das Absorptionsspektrum von SEE ist ein Verhältnis von $E_{280 \text{ nm}} : E_{260 \text{ nm}} = 1,5$, wie in späteren Untersuchungen von YAMADA (1977b) bestätigt wurde. Von BORJA et al. (1972) wurde für SEE ein isoelektrischer Punkt (IP) von 7,0 angegeben, während ODA (1980) in der analytischen IEF fünf IP's (7,0; 7,4; 7,6; 8,0 - Hauptkomponente - und 8,5) registrierte. Zwar gaben auch NOTERMANS et al. (1983) für ihre SEE-Präparation nur einen IP (7,2) an, doch muß dabei berücksichtigt werden, daß sie sich bei der Reinigung der präparativen IEF bedienten und nur eine Fraktion davon verwendeten. Das von ODA beobachtete Phänomen, das auch als Mikroheterogenität der SE bezeichnet wird und eingehender an SEB und SEC (CHANG und DICKIE, 1971; SPERO et al., 1974; METZGER et al., 1975) untersucht wurde, ist vermutlich durch eine sich bei der Bildung oder Reinigung der SE vollziehende partielle Hydrolyse labiler Amidgruppen von Glutamin und Asparagin bedingt.

In seiner Stabilität gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen ist SEE den anderen Enterotoxinen sehr ähnlich. Nach sechsmonatiger Lagerung von gefriergetrocknetem bzw. in Phosphatpuffer, pH 7,0, gelöstem SEE war die serologische Aktivität noch vollständig erhalten (BORJA et al., 1972). Bei Erhitzungsversuchen mit SEE wurde von diesen Autoren mit steigenden Temperaturen ein zunehmender Verlust an serologischer Aktivität beobachtet. Die Inaktivierungsrate war allerdings außer von der Temperatur auch von Einwirkungs-dauer und Reinheitsgrad des eingesetzten SEE abhängig (Übersicht 4).

Im pH-Bereich 2 bis 11 wurde SEE ebensowenig inaktiviert wie durch Zusatz proteolytischer Enzyme (Trypsin, Chymotrypsin, Renin und Papain). Auch Harnstofflösungen bis zu einer Konzentration von 6 mol/l beeinträchtigten die toxische und serologische Aktivität nicht; eine 8 molare Harnstofflösung

Übersicht 4: Inaktivierung von SEE durch Erhitzung

Einwirkungs- tempera- tur (°C)	dauer (min)	serolog. Restakti- vität (%)	Autor(en)
45	120	100 ¹⁾	BORJA et al. (1972)
60	60	90 ¹⁾	"
60	60	90 ²⁾	YAMADA (1977b)
60	120	85 ²⁾	"
80	20	45 ¹⁾	BORJA et al. (1972)
80	30	60 ²⁾	YAMADA (1977b)
80	120	55 ²⁾	"
100	5	5 ¹⁾	BORJA et al. (1972)
100	30	50 ²⁾	YAMADA (1977b)
100	120	0 ²⁾	"

1) gereinigtes SEE 2) ungereinigtes SEE

führte jedoch zu einer 20%igen Teilinaktivierung (BERGDOLL et al., 1974). Nicht gehemmt wurde die Reaktion mit dem Antikörper durch Reduzierung und Alkylierung von SEE. Die Disulfidbrücken sind demnach nicht essentiell für die immunologische Reaktivität (BORJA et al., 1972). Auf Einzelheiten bezüglich der Stabilität von SEE gegenüber verschiedenen Chemikalien, insbesondere Detoxifizierungsmitteln, soll im Hinblick auf die ausführlichen Darstellungen bei TERPLAN und ZAADHOF (1981), WENZEL (1981) sowie ZAADHOF und TERPLAN (1983) hier nicht näher eingegangen werden.

2.1.4 Antigene Eigenschaften

SEE ist ein Protein, das groß genug ist, um in einem Wirbeltierorganismus eine Antikörperbildung anzuregen. Die Reaktion eines Enterotoxins mit dem von ihm induzierten spezifischen Antikörper wurde mit dem Bekanntwerden verschiedener

Enterotoxintypen zur Grundlage ihrer Identifizierung und Differenzierung (CASMAN et al., 1963). Bei der Testung des vom *S. aureus*-Stamm FRI 326 produzierten SEE wurden im Doppelgelddiffusionstest anfänglich keine Reaktionen mit den spezifischen Antikörpern gegen die Enterotoxine A, B, C bzw. D beobachtet (BERGDOLL et al., 1971). Auffälligerweise stellten die Autoren andererseits aber fest, daß SEE nicht nur durch anti-SEE-Serum, sondern auch durch anti-SEA-Serum vollständig neutralisiert werden konnte. Sich anschließende eingehende Untersuchungen von SEA und SEE im Doppelgelddiffusionstest zeigten dann, daß bei hohen Konzentrationen des heterologen Antiserums Kreuzreaktionen auftraten (Abb.1). Dies deutete daraufhin, daß in den heterologen Antiseren ein gemeinsamer Antikörper für beide SE vorhanden war, wenn auch in deutlich geringerer Menge als der für jedes SE spezifische Antikörper. Bestätigt wurde die Existenz zweier verschiedener Antikörper in den beiden Antiseren auch durch das Auftreten von Spornen im Doppelgelddiffusionstest, sobald die Antiseren gegen das homologe und das heterologe SE diffundierten (Abb. 2). BERGDOLL et al. (1971) schlossen daraus, daß SEE und SEA jeweils eine für sie spezifische Hauptantigendeterminante und eine beiden gemeinsame Nebenantigendeterminante besitzen.

TERAYAMA et al. (1974) konnten dagegen bei Untersuchungen des von ihnen gereinigten SEE keinerlei Reaktion mit heterologen anti-SE-Seren feststellen bzw. SEE nur mit anti-SEE-Serum neutralisieren. Aufgrund dieser Ergebnisse bezeichneten sie die Existenz einer gemeinsamen Antigendeterminante auf SEE und SEA als unwahrscheinlich.

SHINAGAWA et al. (1977) wiederum kamen zu Ergebnissen, die mit denen von BERGDOLL et al. (1971) übereinstimmten.

Zur gleichen Zeit berichteten auch YAMADA et al. (1977) von Kreuzreaktionen von SEA und SEE mit den heterologen Antikörperfraktionen bei der passiven Hämagglutination. Die dabei eingesetzten Antikörperfraktionen waren affinitätschromatographisch durch Immunadsorption an das homologe Enterotoxin gereinigt worden.

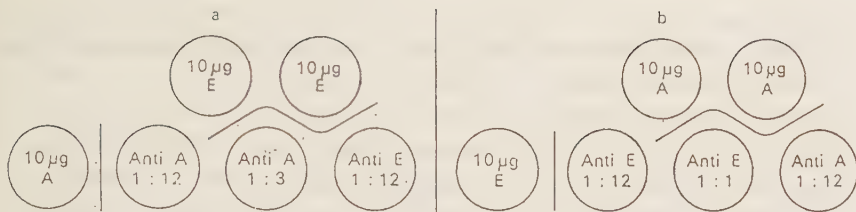


Abb. 1: Reaktion der Enterotoxine A und E mit spezifischen anti-SEA- und anti-SEE-Seren im Doppeldiffusionstest.

- a) Enterotoxin E gegen anti-SEE-Serum normaler Konzentration (1 Teil Antiserum plus 11 Teile Puffer) und gegen anti-SEA-Serum normaler und hoher Konzentration (1 Teil Antiserum plus 2 Teile Puffer).
- b) Enterotoxin A gegen anti-SEA-Serum normaler Konzentration und gegen anti-SEE-Serum normaler und hoher Konzentration. (aus BERGDOLL et al., 1971)

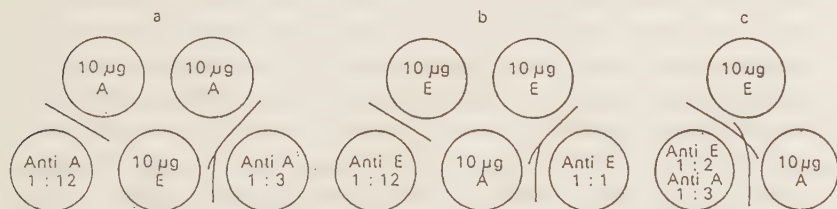


Abb. 2: Reaktion der Enterotoxine A und E mit spezifischen anti-SEA- und anti-SEE-Seren im Doppeldiffusionstest.

- a) Enterotoxine A und E gegen anti-SEA-Serum normaler (1 Teil Antiserum plus 11 Teile Puffer) und hoher Konzentration (1 Teil Antiserum plus 2 Teile Puffer).
 - b) Enterotoxine A und E gegen anti-SEE-Serum normaler und hoher Konzentration (unverdünnt).
 - c) Enterotoxine A und E gegen anti-SEA- und anti-SEE-Serum hoher Konzentration (2 Teile anti-SEA-Serum plus 3 Teile anti-SEE-Serum plus 1 Teil Puffer).
- (aus BERGDOLL et al., 1971)

Der Nachweis der gemeinsamen Antigendeterminante gelang durch Immunabsorption von anti-SEA- und anti-SEE-Seren am jeweils heterologen, immobilisierten SE-Typ mit anschließender Desorption der gemeinsamen Antikörper (LEE et al., 1978). Die absorbierten Seren reagierten im Geldiffusionstest nicht mehr mit dem heterologen SE. Bei der Untersuchung der desorbierten gemeinsamen Antikörper im Geldiffusionstest zeigte sich, daß zur Präzipitation von SEA mehr Antikörper notwendig waren als zur Präzipitation von SEE. Die Autoren schlossen daraus, daß auf SEA mehr Determinanten für den gemeinsamen Antikörper vorhanden sind als auf SEE. Auf diesem wiederum ist die gemeinsame Determinante wenigstens doppelt vorhanden.

Die Kreuzreaktion von SEE mit anti-SEA tritt auch bei monoklonalen Antikörpern auf. Nach EDWIN et al. (1984) reagierte einer von vier gegen SEA entwickelten monoklonalen Antikörpern im indirekten ELISA stark, die anderen drei schwach mit SEE. Gegenüber SEB, SEC₁ und SED wurde bei allen vier monoklonalen Antikörpern eine sehr schwache Reaktion beobachtet. Auch NOTERMANS et al. (1984a) erhielten neben einem monoklonalen Antikörper, der spezifisch mit SEA reagierte, einen zweiten, der mit SEA und SEE gleichermaßen reagierte.

Zuvor hatten MEYER et al. (1984) von einem nach Immunisierung mit SEA und SED gewonnenen monoklonalen Antikörper berichtet, der die höchste Affinität gegenüber SEB und SEC₁ aufwies, aber auch mit SEA, SED und SEE reagierte.

THOMPSON et al. (1986) entwickelten schließlich monoklonale Antikörper gegen jeden einzelnen bekannten SE-Typ. Von vier gegen SEA produzierten monoklonalen Antikörpern reagierte einer kreuz mit SEE. Von vier gegen SEE produzierten Antikörpern reagierten zwei mit SEA, einer dieser beiden zusätzlich schwach mit SED. Über weitere Kreuzreaktionen von SEE bzw. anti-SEE wurde in der Literatur nicht berichtet.

Über die bei Immunisierungen mit SEE erzielten Antikörpertiter liegen unterschiedliche Angaben vor (YAMADA et al., 1977; RICHTER und KARSCH, 1980; ROBBINS und BERGDOLL, 1984). Diese Daten sind allerdings auch nur mit Einschränkungen

vergleichbar, da zwar alle Autoren Kaninchen zur Immunisierung heranzogen, aber unterschiedliche Immunisierungsschemata zur Anwendung kamen. Die von YAMADA et al. (1977) und RICHTER und KARSCH (1980) gegen SEE erzielten Titer blieben deutlich hinter jenen gegen SEB und SEC zurück. ROBBINS und BERGDOLL (1984) dagegen erhielten im Durchschnitt die besten Titer bei der Immunisierung mit SEC₂ und SEE. Sie empfahlen jedoch für die Immunisierung mit SEA und SEE mehr Toxin einzusetzen als für jene mit SEB und SEC. Bedeutsamer als mögliche Unterschiede der antigenen Wirksamkeit der SE sind jedoch die starken Unterschiede in der Immunantwort der einzelnen Tiere (ROBBINS und BERGDOLL, 1984). Auf die Stabilität der antigenen Eigenschaften gegenüber chemisch-physikalischen Einflüssen wurde bereits in Abschnitt 2.1.3 eingegangen.

2.1.5 Toxische Eigenschaften

SEE ruft, wie die anderen SE, nach oraler Aufnahme eine Staphylokokken-Intoxikation hervor. Dabei kommt es nach einer Inkubationszeit von einer bis sechs Stunden zu Übelkeit, Erbrechen, Würgen, abdominalen Krämpfen und Durchfall. In ernstesten Fällen werden auch Kopfschmerzen, Muskelkrämpfe, Schwächeanfälle, Fieber oder auch Abfall der Körpertemperatur in den subnormalen Bereich, Blutdruckabfall und starke Nierenschmerzen beobachtet. Die Schwere der Erkrankung hängt von der Menge des aufgenommenen SE und der Empfindlichkeit des Einzelnen ab. Gewöhnlich kommt es zu einer raschen Erholung des Erkrankten innerhalb von ein bis drei Tagen. Todesfälle sind äußerst selten (BERGDOLL, 1979; 1983).

Die Toxizität von gereinigtem SEE bei Rhesusaffen entspricht etwa der von SEA, SEB und SEC. In entsprechenden Versuchen reichten 10 µg (intragastral) bzw. 0,5 µg SEE (intravenös) aus, um Erbrechen auszulösen (BERGDOLL et al., 1971). Nach BORJA et al. (1972) führte die orale Verabreichung von 10-20 µg SEE bei 60 % der Affen zum Erbrechen. Auf Unterschiede in der Toxizität von SEA und SEE einerseits sowie SEB und SEC

andererseits schlossen ROBBINS und BERGDOLL (1984) aufgrund von Immunisierungsversuchen mit SE. Ihren Angaben zufolge machte eine höhere Toxizität von SEA und SEE bei Kaninchen eine Immunisierung mit niedrigeren Anfangsdosierungen notwendig.

Es sind keine Untersuchungen über die Toxizität von SEE nach oraler Verabreichung an Menschen bekannt, jedoch kann aufgrund der Beobachtungen an Affen davon ausgegangen werden, daß alle SE-Typen auch für den Menschen eine vergleichbare Toxizität aufweisen. Die mittlere krankmachende Dosis dürfte analog den Untersuchungen von DANGERFIELD (1973) mit SEA, SEB bzw. SEC ungefähr $0,14 \mu\text{g/kg}$ Körpergewicht betragen. Über klinische Symptome nach aerogener Applikation von SEE ist bisher nichts bekannt.

Ergebnisse zur Stabilität der toxischen Aktivität von SEE liegen ebenfalls nicht vor. Jedoch verdient in diesem Zusammenhang die Arbeit von STELMA und BERGDOLL (1982) Beachtung. Diese Autoren untersuchten die Wirkung der Carboxymethylierung von Histidinresten des SEA und beobachteten dabei einen fast vollständigen Verlust der Toxizität bei gleichzeitig nur schwach beeinträchtigter serologischer Aktivität. Das Vorkommen von Histidin im allen SE gemeinsamen toxischen Zentrum läßt auf eine wichtige Rolle für die Toxizität schließen und zugleich auf eine Übertragbarkeit dieser an SEA gewonnenen Erkenntnisse auf alle SE. Für SEB wurde das bereits bestätigt (SCHEUBER et al., 1985), für SEE steht dies noch aus.

2.2 Affinitätschromatographie als hochspezifische Trennmethode

2.2.1 Allgemeines

Die Affinitätschromatographie ist eine Methode zur Reinigung biologischer Verbindungen. Während konventionelle Verfahren zur Proteinreinigung (bspw. Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltration, IEF u.a.) auf der Ausnutzung relativ kleiner

Unterschiede in den physikalisch-chemischen Eigenschaften der zu trennenden Proteine beruhen, nutzt die Affinitätschromatographie die sehr spezifischen biologischen Funktionen von Proteinen und Polypeptiden. Die Affinitätschromatographie läuft prinzipiell (s.a. Abb. 3) so ab, daß eine Lösung mit der abzutrennenden erwünschten Komponente auf eine in einer Säule befindliche Matrix aufgegeben wird, an die der spezifische (Bio)Ligand kovalent gebunden ist. Die Bestandteile der Lösung ohne Affinität zum Liganden passieren die Säule ungehindert, während jene, die den Liganden "erkennen", aufgrund ihrer Affinität zurückgehalten werden. Durch geeignete Veränderung der Eigenschaften des Elutionsmittels kann die spezifisch adsorbierte Substanz vom Liganden abgedrängt und in hochgereinigter Form ausgewaschen werden (CUATRECASAS und ANFENSEN, 1971; CUATRECASAS, 1972). Von entscheidender Bedeutung für den erfolgreichen Ablauf der Affinitätschromatographie sind insbesondere Art der Matrix, Art des Liganden und Durchführung der kovalenten Bindung des Liganden an die Matrix sowie die Bedingungen, unter denen das gewünschte Molekül zuerst an den Liganden gebunden und dann von ihm abdissoziiert wird. Obwohl einige generelle Richtlinien existieren, müssen die Bedingungen auf die jeweilige Substanz und ihre spezifischen, biologischen Eigenschaften zugeschnitten sein. Auf Einzelheiten soll daher an dieser Stelle nicht eingegangen werden.

Dieses Prinzip, für das CUATRECASAS et al. (1968) den Begriff Affinitätschromatographie einführten, wurde ursprünglich für die Reinigung von Enzymen (HOLMBERGH, 1933; THAYER, 1953; LERMAN, 1953; LELOIR und GOLDEMBERG, 1960), Antikörpern (CAMPBELL et al., 1951) und Nukleinsäuren (BAUTZ und HALL, 1962; BOLTON und McCARTHY, 1962) entwickelt, kann aber zur Isolierung fast jeden Makromoleküls herangezogen werden (COOPER, 1981). Das Verfahren gelangte rasch zu einer immer stärkeren Verbreitung. Da eine Darstellung der heute bekannten Anwendungsbereiche und -varianten den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde, sei auf die Übersichtsarbeiten von SCOUTEN (1981); NISHIKAWA (1983) und MOHR und POMMERENING (1985) hingewiesen.

Abb. 3: Ablauf einer Affinitätschromatographie. (a) Schritt 1: Immobilisieren des Bioliganden. (b) Schritt 2: Vorbereiten des Rohextraktes. (c) Schritt 3: Aufgeben des Extraktes auf eine Säule mit dem Adsorbens. (d) Schritt 4: Auswaschen des unerwünschten Proteins. (e) Schritt 5: Elution des gesuchten Proteins, evtl. wie hier unter Verwendung von freiem Bioliganden (Aus SCOUTEN, 1981)

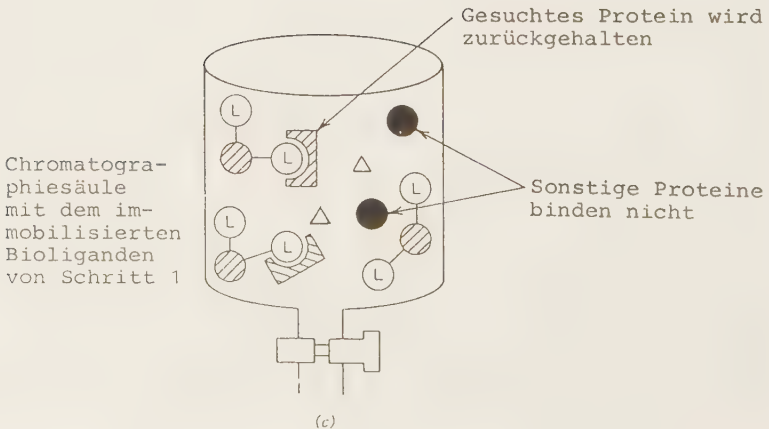
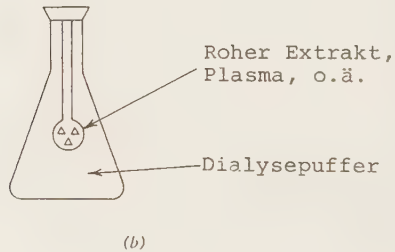
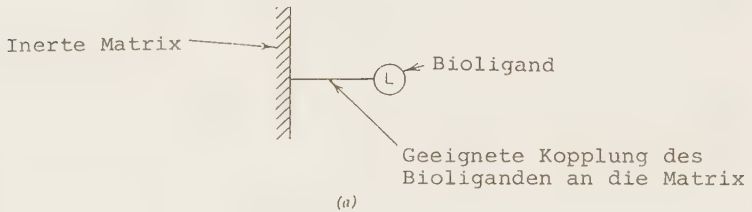
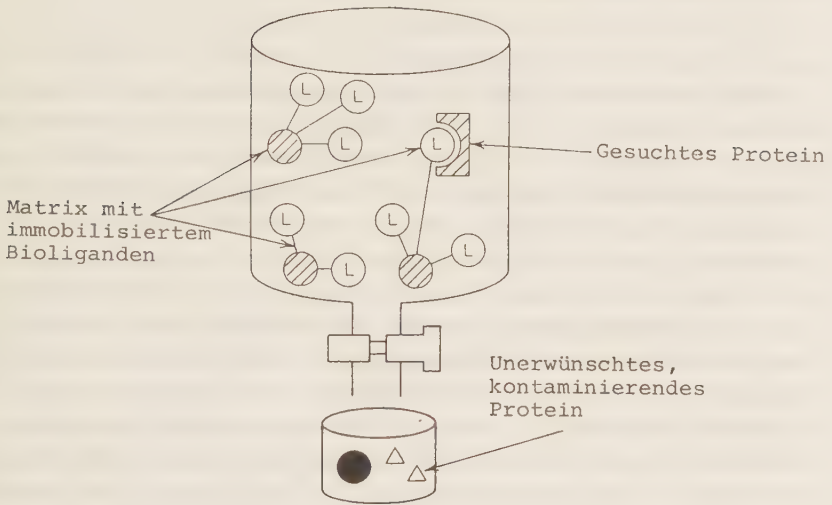
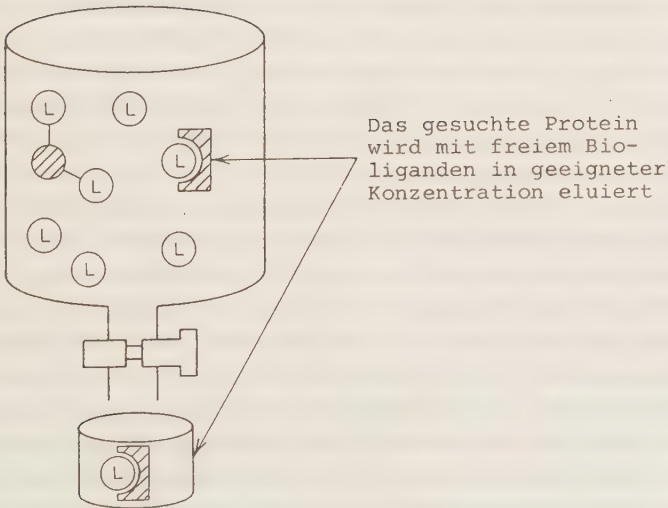


Abb 3: (Fortsetzung)



(d)



(e)

2.2.2 Immunaффinitätschromatographie

2.2.2.1 Allgemeines

Die Immunaффinitätschromatographie ist der Teilbereich der Affinitätschromatographie, der die Reinigung von Antigenen bzw. Antikörpern beinhaltet. Die Grundlage des Verfahrens bildet die Eigenschaft von Antikörpern, mit dem für sie spezifischen Antigen eine sehr feste Bindung einzugehen, die normalerweise zur Bildung eines unlöslichen Komplexes führt (SCOUTEN, 1981).

Das hohe Molekulargewicht von IgG begrenzt merklich die Menge, die an der Matrix immobilisiert werden kann. So können an 4%iger Agarose höchstens 30 mg IgG pro ml Gel gebunden werden, was unter Berücksichtigung zweier Antigenbindungsstellen im IgG-Molekül etwa $0,375 \mu\text{eq}$ pro ml Gel entspricht. Im Vergleich dazu können von einem niedermolekularen Liganden wie z. B. p-Aminobenzamidin 20 bis $30 \mu\text{eq}$ pro ml Gel gebunden werden (NISHIKAWA, 1983). Ein Ligand wie IgG steht niemals mit der sich aus der matrixgebundenen Gesamtmenge theoretisch zu errechnenden Kapazität zur Verfügung. So wird der immunreaktive Anteil als Folge des "crowding"-Effekts und der daraus resultierenden gegenseitigen sterischen Behinderung der Antikörper um so geringer, je mehr IgG pro ml Gel gekoppelt wird (COMOGLIO et al., 1976). Aufgrund der Größe des IgG-Moleküls muß außerdem auch von einer Mehrfachanbindung an die Matrix ausgegangen werden. Diese Mehrfachanbindung führt ebenfalls zu einer relativen Abnahme der Immunreaktivität aufgrund sterischer Behinderungen und Umfaltungen des Antikörpermoleküls (CUATRECASAS und ANFENSEN, 1971). Dieses Phänomen ist natürlich abhängig vom Aktivierungsgrad der Matrix, also von der Zahl der geschaffenen Bindungsstellen (KRISTIANSEN, 1978). Eine zu stark aktivierte Matrix führt ebenfalls zu einem nachteiligen Effekt: Der ankoppelnde Ligand bildet eine Hülle auf der äußeren Oberfläche der Matrixpartikel und versperrt so den Zugang in ihr Inneres, wie DAVID et al. (1974) zeigten.

Die Folge einer relativ geringen Konzentration an immunreaktivem IgG auf der Matrix ist eine, von der Molekülgröße des Antigens abhängige, begrenzte Antigenmenge, die pro ml Gel absorbiert werden kann (NISHIKAWA, 1983).

Eine Methode zur Herstellung einer hocheffizienten Immunmatrix beschrieben SCHNEIDER et al. (1982). Sie immobilisierten einen monoklonalen Antikörper an Protein A-Sepharose und stabilisierten diesen Komplex durch chemische Vernetzung mit Dimethylpimelimidatdihydrochlorid. Durch die Anbindung des Antikörpers über den Fc-Teil kam es dabei zu einer günstigen räumlichen Ausrichtung und maximaler Antigenbindungsfähigkeit. Die Herstellung einer solchen Immunmatrix ist jedoch nur mit Antikörpern möglich, die an Protein A binden. Die Antikörper eines polyklonalen Serums weisen ein relativ breites Spektrum an Affinitätskonstanten auf. Die Wechselwirkungen zwischen einem multivalenten Antigen und bivalentem IgG sind dabei oft durch hohe Affinitätskonstanten im Bereich von 10^{10} - 10^{11} M⁻¹ charakterisiert. Da es meist nicht möglich ist, eine spezifische Elution unter Verwendung von freiem Liganden durchzuführen, muß eine unspezifische Desorption durchgeführt werden. Die hierfür erforderlichen Bedingungen sind in der Regel so drastisch, daß es zur Schädigung von Ligand und/oder Ligat kommen kann.

Die auf der gemeinsamen Wirkung von Coulomb-Kräften, Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophoben Bindungen und van der Waals'schen Kräften beruhende Antigen-Antikörper-Bindung (KARUSCH, 1963) wird dabei insbesondere durch Änderung des pH-Milieus und durch Einsatz chaotroper Salze aufgebrochen. Nach KRISTIANSEN (1978) lösen sich Antigen-Antikörper-Komplexe im Bereich von pH 2,8-2,5, wobei der Desorptionsmechanismus auf der Änderung der Ladungsverhältnisse beruht (CROOK et al., 1972). Lösungen chaotroper Salze eignen sich in einer Konzentration bis zu 3 mol/l zur Trennung von Antigen-Antikörper-Komplexen (KRISTIANSEN, 1974). Als "chaotrope Ionen" werden Ionen mit einem großem Volumen/Ladungsverhältnis bezeichnet (Abb. 4), die die Polarität des Wassers herabsetzen und so hydrophobe Interaktionen beeinträch-

tigen (HAMAGUCHI und GEIDUSCHEK, 1962). Weitere Ausführungen zu den chaotropen Ionen bzw. ihrem Effekt auf Antigen-Antikörper Komplexe finden sich bei DANDLIKER und de SAUSSURE (1971) bzw. LEVISON et al. (1970). Wie bereits angesprochen, können sowohl die starken pH-Wertänderungen als auch die konzentrierten Lösungen chaotroper Salze in mehr oder minder starkem Umfang zu Schädigungen von Antigen und Antikörper führen (SAIRAM et al., 1974). Wenn man dieses vermeiden möchte, muß bei der Desorption unter Umständen auf die Gewinnung sehr fest gebundener Ligate verzichtet werden. Das führt bei der Antikörperreinigung zu einem stetigen Nachlassen der Kapazität des Immunosorbens (KRISTIANSEN, 1978). Im Übrigen sollte die Elution in umgekehrter Richtung erfolgen, wenn Antikörper an einen Liganden adsorbiert werden. Hiermit kann vermieden werden, daß hochaffine Antikörper, die im oberen Teil der Säulenmatrix gebunden werden, bei der Desorption die gesamte Säule durchlaufen müssen und dabei zu einem "tailing"-Effekt führen (KRISTIANSEN, 1978).

← ansteigender Aussalzungseffekt

Anionen:

PO_4^{3-} ; SO_4^{2-} ; CH_3COO^- ; Cl^- ; Br^- ; NO_3^- ; ClO_4^- ; J^- ; SCN^-

Kationen:

NH_4^+ ; Rb^+ ; K^+ ; Na^+ ; Cs^+ ; Li^+ ; Mg^+ ; Ca^{2+} ; Ba^{2+}

ansteigender chaotroper Effekt →

Abb. 4: Anionen und Kationen mit unterschiedlich ausgeprägtem Einfluß auf hydrophobe Wechselwirkungen

Diese kurz angerissenen Besonderheiten machen eine weitgehend empirische Abstimmung der Bedingungen für jede individuelle Anwendung der Immunaffinitätschromatographie notwendig (KRISTIANSEN, 1978).

2.2.2.2 Isolierung von Staphylokokken-Enterotoxinen

Die erste Mitteilung über den Einsatz der Immunaффinitätschromatographie zur Isolierung von Staphylokokken-Enterotoxin stammt von GENIGEORGIS und KUO (1976). Diese Autoren koppelten anti-SEB-Kaninchen IgG an CNBr-aktivierte Sepharose 4B und isolierten mit diesem Immunosorbens SEB aus Kulturüberständen, Lebensmittelextrakten und Pufferlösungen in einem Einschnitt-Verfahren. Die Wiederfindungsrate betrug bei Lebensmitteln über 75 % und bei Pufferlösungen über 95 %. Das Immunosorbens adsorbierte jedoch neben SEB auch andere nicht identifizierte hämagglutinierende Substanzen. 1978 berichteten NIYOMVIT et al. über ein affinitätschromatographisches Verfahren zum Nachweis von SEB, das zugleich eine Variante des Radioimmunoassay darstellt. CNBr-aktivierte Sepharose 4B, mit anti-SEB gekoppelt, diente als Säulenmatrix. Der Nachweis von SEB erfolgte, indem zuerst die Probe die Säule passierte und anschließend ^{125}J -markiertes SEB. Nach Spülung der Säule mit Phosphatpuffer pH 7,5, wurde mit NH_4OH pH 10,5, das SEB vom Immunosorbens abdissoziiert und der Anteil des ^{125}J -markierten SEB gemessen, der sich umgekehrt proportional zum SEB in der Probe verhält. Die Nachweisgrenze für SEB in diesem System betrug 1,2 ng/ml in Phosphatpuffer pH 7,5, in Magermilch 2,2 ng/ml und 6,3 ng/ml in Hamburgerextrakt.

Den Einsatz der Affinitätschromatographie zur präparativen Isolierung von SE beschrieben KUO und GENIGEORGIS (1978). Sie koppelten F(ab')_2 -Fragmente von anti-SEA- bzw. anti-SEB-IgG an CNBr-aktivierte Sepharose 4B und reinigten mit diesem Immunosorbens SEA bzw. SEB in einem Einschnitt-Säulenverfahren direkt aus Kulturüberstand. In der Gelelektrophorese wiesen die so erhaltenen Präparationen nur eine Bande auf. Die Autoren empfahlen das Verfahren mit dem Hinweis auf die Regenerierbarkeit der Säule zur Reinigung von größeren SE-Mengen.

Die jüngste Mitteilung über eine affinitätschromatographische Isolierung von SE stammt von MEYER et al. (1984).

Ein monoklonaler Antikörper, der mit allen bekannten SE-Typen reagierte (siehe 2.1.4), wurde nach der Methode von SCHNEIDER et al. (1982) an Protein A-Sepharose gebunden. Diese Immunmatrix wurde mit Erfolg zur Isolierung von SEA und SED aus Pufferlösungen eingesetzt. Die Versuche beschränkten sich jedoch nur auf die Prüfung des Prinzips. Weitere Details zu den einzelnen Methoden finden sich in Übersicht 5 (Abschnitt 2.2.2.3).

2.2.2.3 Präparation von anti-SE-Serum

Über den Einsatz der Affinitätschromatographie zur Präparation eines anti-SE-Serums berichteten erstmals TERAYAMA et al. (1976). Dabei wurden zwei verschiedene Verfahren angewendet, ein direktes zur anti-SEA Präparation und ein indirektes zur anti-SED Präparation. Im direkten Verfahren wurde gereinigtes SEA an CNBr-aktivierte Sepharose 4B gebunden und mit dieser Matrix eine Säule gepackt. Nachdem anti-SEA-Rohserum die Säule passiert hatte, wurden durch Elution mit Glycin-HCl-Puffer pH 2,3 die spezifischen Antikörper vom SEA abdissoziiert. Beim indirekten Verfahren wurde eine bei der Reinigung von SED gewonnene nichtenterotoxinhaltige Fraktion an CNBr-aktivierte Sepharose 4B gebunden. Mit diesem Immunosorbens wurden aus einem anti-SED-Serum unspezifische, nicht gegen SED gerichtete Antikörper absorbiert. Nach der Elution der unspezifischen Antikörper mit Glycin-HCl-Puffer pH 2,3 war dann die Säule für die nächste Absorption regeneriert. Beide Verfahren führten die Autoren je 20 Mal durch, ohne ein Nachlassen der Matrixaktivität feststellen zu müssen. Die direkte Methode wurde später zur Präparation von spezifischen Antikörperfraktionen für die Erstellung eines Nachweisverfahrens auf der Basis der passiven Hämagglutination für alle bekannten SE-Typen angewendet (YAMADA et al., 1977). Gegenüber dem Rohserum wiesen die Präparationen eine 13,3 bis 18,3 Mal höhere spezifische Aktivität auf. Da die Immunadsorption aber nur am homologen SE vorgenommen wurde, traten im Testsystem Kreuzreaktionen

zwischen SEE und anti-SEA sowie SEA und anti-SEE auf (siehe auch 2.1.4)

NOTERMANS et al. (1978) modifizierten die von TERAYAMA et al. (1976) beschriebene indirekte affinitätschromatographische Reinigung, indem sie den Kulturüberstand eines nichtenterotoxinogenen *S. aureus*-Stammes an CNBr-aktivierte Sepharose 4B koppelten. Mit Hilfe dieser Matrix gelang es den Autoren ebenso wie später FEY (1982) unspezifische Antikörper aus anti-SE-Serum zu entfernen.

Um über die Antigenstruktur von SEA und SEE näheren Aufschluß zu erhalten, führten LEE et al. (1978) Affinitätschromatographien mit anti-SEA- bzw. anti-SEE-Seren an auf CNBr-aktivierter Sepharose 4B immobilisiertem, hochgereinigtem SEE bzw. SEA durch. Dabei konnten spezifische und gemeinsame Antikörperfraktionen gegen SEA und SEE isoliert werden. Bei vergleichbaren Untersuchungen an SEB, SEC₁ und SEC₂ gelang LEE et al. (1980) dann erneut die Isolierung gemeinsamer Antikörperfraktionen. Wie schon 1978 vermerkten die Autoren auch in dieser Arbeit, daß im heterologen System bei der Passage eines Serums neben den gemeinsamen auch gewisse Mengen spezifischer Antikörper adsorbiert werden. Diese spezifischen Antikörper konnten durch vorhergehende Elution mit 1,5 mol/l NaSCN von den gemeinsamen Antikörpern getrennt werden.

In Übersicht 5 sind die wesentlichen Angaben zur Art des jeweiligen Liganden, der Matrix und des Elutionsmittels zusammengefaßt.

Übersicht 5: Affinitätschromatographie zur Isolierung von SE und Präparation von anti-SE

Ligand	Matrix	Ligand pro ml Matrix	Elution	Autoren
IgG	CNBr-akt. Sepharose 4B	0,5 mg	0,2 mol/l Glycin-HCl- Puffer, pH 2,8 + 0,5 mol/l NaCl	GENIGEORGIS und KUO (1976)
Anti-SE- Serum	"	0,007 mg	0,13 mol/l NH_4OH , pH 10,5 + 0,15 mol/l NaCl	NIYOMVIT et al. (1978)
F(ab)' ₂	"	?	?	KUO und GENIGEORGIS (1978)
Monoklonales IgG	Protein A- Sepharose	2 mg	0,05 mol/l Diäthylamin, pH 11,5 in 5% NaDesoxycholat	MEYER et al. (1984)
SE; Exopro- tein von S. aureus	CNBr-akt. Sepharose 4B	?	0,2 mol/l Glycin-HCl- Puffer, pH 2,3	TERAYAMA et al. (1976)
SEA - SEE	"	?	0,2 mol/l Glycin-HCl- Puffer, pH 2,3	YAMADA et al. (1977)
SEA; SEE	"	?	1,5 - 3 mol/l NaSCN; 0,2 mol/l Glycin-HCl- Puffer, pH 2,8	LEE et al. (1978)
SEB; SEC ₁ ; SEC ₂	"	?	"	LEE et al. (1980)
Kulturüber- stand von S. aureus	"	?	?	NOTERMANS et al. (1978); FEY (1982)

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Immunisierungsversuche mit SEE

3.1.1 Material

Als Antigen wurde durch Ionenaustauschchromatographie an SP-Sephadex C-25 (Pharmacia) nach IGARASHI et al. (1984), Chromatofokussierung in Anlehnung an ENDE et al. (1983), Gelfiltration an Sephadex G-75 (Pharmacia) und Entsalzung an Sephadex G-25 fine (Pharmacia) gereinigtes SEE verwendet. Die Proteinkonzentration dieses Materials wurde durch photometrische Messung bei 277 nm unter Berücksichtigung des von BORJA et al. (1972) für SEE angegebenen Extinktionskoeffizienten $E (1 \% ; 1 \text{ cm}) = 12,5$ ermittelt. Die Untersuchung dieses Materials im Objektträger-Gel-Diffusionstest (SOMMERFELD und TERPLAN, 1975) ergab keine Kreuzreaktionen mit anti-SEA, -SEB, -SEC₁ und -SED. Die Reinheitsüberprüfung des Materials in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach GÖRG et al. (1982) zeigte, daß Material im Molekulargewichtsbereich von SEE (ca. 29.000 D) und etwas darunter (ca. 27.000 D) sowie im Bereich um 15.000 D vorlag (SEE 'A' in Abb. 28c). Eine zweite ab der vierten Boosterinjektion eingesetzte Charge wies in der SDS-PAGE nur eine einzige Bande bei ca. 29.000 D auf (siehe SEE 'B' in Abb. 28c).

Für die Immunisierung standen zwei dreijährige Deutsche Merinolandschafe zur Verfügung. Sie wurden während der Versuchsphase im Stall gehalten. Vor Immunisierungsbeginn wurden die Seren der Tiere auf die Anwesenheit von Antikörpern (SOMMERFELD und TERPLAN, 1975) gegen SEA, SEB, SEC₁ und SED mit negativem Resultat untersucht. Diese Untersuchungen wurden mit Referenztoxinen und -antisera von Prof. Bergdoll sowie mit Toxinen aus hauseigener Produktion durchgeführt. Die verwendeten Reagenzien und Chemikalien stammten, sofern

nicht ein anderer Hersteller genannt wird, von der Firma Merck.

3.1.2 Methodik

3.1.2.1 Immunisierung

Die Immunisierung der Schafe erfolgte in Anlehnung an ein Schema von NOTERMANS (1982). Dazu wurden 10 μ g SEE in 1 ml phoshatgepufferter Kochsalzlösung, pH 7,2 (0,116 mol/l NaCl + 0,01 mol/l Na_2HPO_4 + 3,2 mmol/l KH_2PO_4 = PBS) mit 1 ml komplettem Freund'schem Adjuvans (Sigma) emulgiert und den Tieren an vier Stellen verteilt intramuskulär injiziert. In Abständen von zehn Tagen erfolgten dann Applikationen von 20, 40, 100 und 200 μ g SEE in der gleichen Weise, jedoch war das Toxin im Verhältnis 1:1 mit inkomplettem Freund'schem Adjuvans (Sigma) emulgiert. Abweichend vom Schema nach NOTERMANS (1982) erfolgten 4, 7, 12, 16, 20 bzw. 24 Wochen nach der Grundimmunisierung insgesamt sechs Boosterinjektionen zur weiteren Steigerung der Antikörpertiter. Dabei wurden 0,2 mg SEE bei der ersten bis dritten und 0,28 mg bei der vierten bis sechsten Boosterung jeweils in 1 ml PBS, emulgiert mit 1 ml inkomplettem Freund'schem Adjuvans wie oben eingesetzt. Ab der vierten Boosterinjektion wurde die Enterotoxincharge SEE 'B' verwendet, weil die Charge SEE 'A' aufgebraucht war.

3.1.2.2 Bestimmung des Antikörpertiters

Im Verlauf der Immunisierung wurde den Tieren sechs Tage nach der dritten und vierten, 24 Tage nach der fünften Grundimmunisierungsinjektion sowie jeweils zehn Tage nach jeder Boosterinjektion Blut entnommen. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde das Blut über Nacht bei 4 °C aufbewahrt, und durch Zentrifugieren (20 min bei 3000 U/min) das Serum gewonnen. Dieses wurde durch halbstündige Inkubation bei 56 °C inaktiviert und anschließend mit der nach

SOMMERFELD und TERPLAN (1975) modifizierten OUCHTERLONY-Technik analysiert. Die Referenztoxine wurden dabei in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt.

3.1.3 Ergebnisse

Die Schafe zeigten während der Immunisierung keine Störung des Allgemeinbefindens. Den Verlauf der Immunisierung und die ermittelten Antikörpertiter zeigt die Abbildung 6. Nach Abschluß der Grundimmunisierung wurde bei beiden Schafen ein anti-SEE-Präzipitationstiter von 1:128 festgestellt. Dieser Titer konnte durch die Boosterinjektionen bei Schaf 3 auf 1:320 und bei Schaf 4 auf 1:400 erhöht werden. Nach der zweiten Boosterinjektion wurde bei beiden Schafen ein anti-SEA-Präzipitationstiter von 1:8 festgestellt. Der Titer betrug nach der sechsten Boosterinjektion bei Schaf 3 1:16 und bei Schaf 4 1:32. Antikörpertiter gegen andere SE wurden nicht gefunden. Zwölf Tage nach der letzten Boosterinjektion wurden beiden Tieren je 400 ml Blut entnommen. Daraus konnten 230 ml (Schaf 4) bzw. 205 ml (Schaf 3) Serum gewonnen werden.

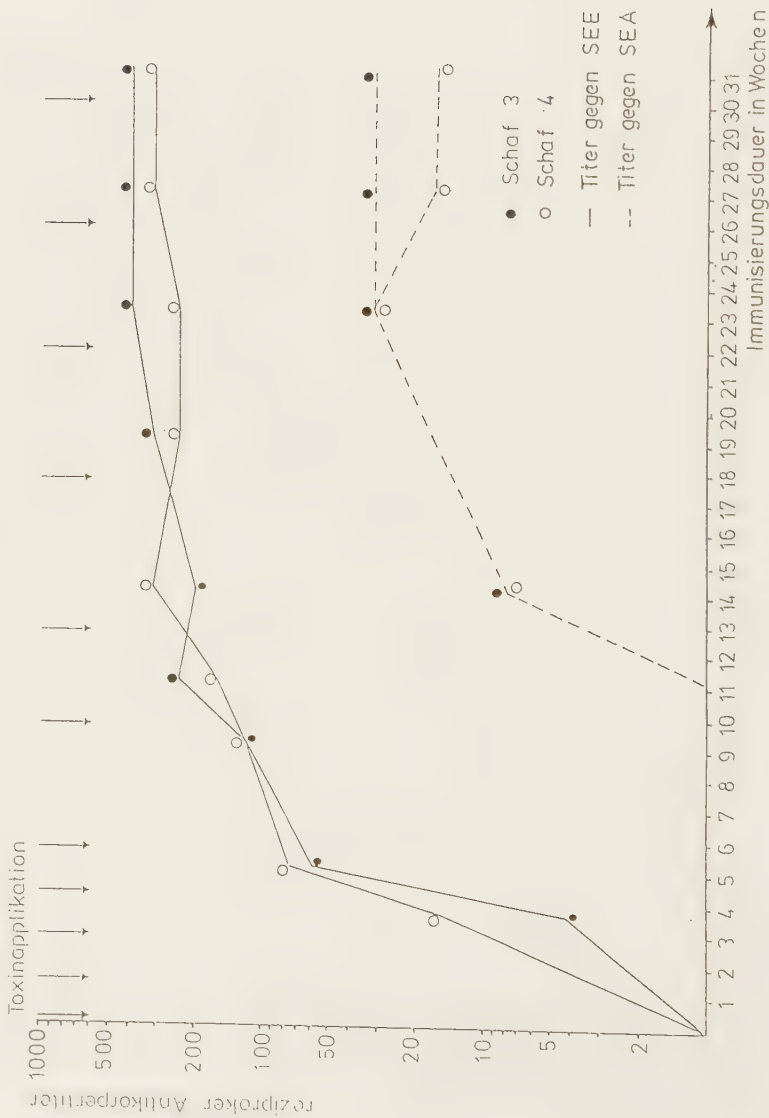
3.2 Charakterisierung des Antiserums mittels Immunelektrophorese nach GRABAR und WILLIAMS (1953)

Zur weiteren Charakterisierung des nach 3.1 erhaltenen anti-SEE-Schafserums wurde es in der Immunelektrophorese nach GRABAR und WILLIAMS (1953) gegen verschiedene Kulturüberstände und andere mögliche Reaktionspartner getestet.

3.2.1 Material

Zur Durchführung der Immunelektrophorese stand eine Multiphor Elektrophoreseausstattung (LKB) und ein Multiphor Immunelektrophoresekit (LKB) mit Zubehör zur Verfügung. Es wurde Litex-Agarose Typ HSA (Paesel, 06-114-01) verwendet. Barbitalpuffer, Tricin und Tris-(hydroxymethyl)aminomethan

Abb. 6: Immunantwort von Schafen nach Immunisierung mit SEE



stammten von der Firma Sigma, Serva Blau R 250 von der Firma Serva, alle übrigen Chemikalien wurden von der Firma Merck in p. A. Qualität bezogen.

Als Reaktionspartner wurden eingesetzt:

- Gereinigte Enterotoxine A bis E aus hauseigener Produktion,
- Gereinigte Enterotoxine A und E von Prof. Bergdoll,
- Hirn-Herz-Bouillon (BHI), (Oxoid),
- alpha-Hämolysin, gereinigt (Behring, Marburg),
- Kulturüberstände der SE-bildenden *S. aureus*-Stämme FRI 722 (SEA), FRI 137 (SEC₁) sowie des nichtenterotoxinogenen FRI 184. Die Kulturüberstände waren aus BHI-Standkulturen (24-48 h, 37 °C) durch Zentrifugation (18.000 g, 20 min) gewonnen worden.
- Exoproteine von *S. aureus*-Stamm FRI 137 (Pools 1a, 1b, 1c, 2a, 2b), die bei der Chromatofokussierung bei einem pH > 8,7 abgetrennt worden waren.

Zur Kontrolle wurde auch Serum von Schafen, die mit SEC₁ bzw. SED immunisiert worden waren, gegen diese potentiellen Reaktionspartner getestet.

3.2.2 Methodik

Die praktische Durchführung der Immunelektrophorese erfolgte gemäß einer Instruktion des Geräteherstellers (LKB Application Note 249).

3.2.3 Ergebnisse

Einen Überblick über die Reaktionen des anti-SEE-Serums von Schaf 4 mit verschiedenen Reaktionspartnern geben die Abbildungen 7a-c. Außer mit den Enterotoxinen A und E reagierte das Serum auch mit den drei Kulturüberständen, den Exoprotein-Pools 1b, 1c und 2a von *S. aureus* FRI 137 sowie dem alpha-Hämolysin. Die Präzipitationen mit den einzelnen Reaktionspartnern lieferten ein zum Teil sehr komplexes Linienbild, in Abhängigkeit von ihrem Gehalt an antikörperreaktivem Protein.

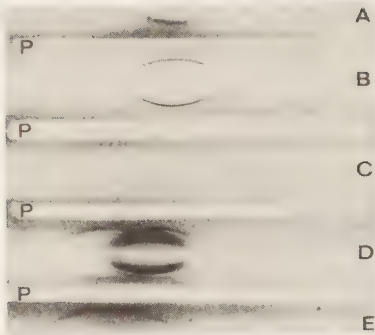


Abb. 7a:

Immunelektrophorese mit Serum von Schaf 4 (P) gegen Pool 1c (A), -Hämolysin (B), KÜ von FRI 184 (C), Pool 2a (D) und Pool 1b (E).

Kathodenseite: links

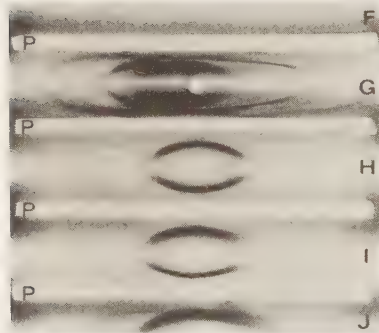


Abb. 7b:

Immunelektrophorese mit Serum von Schaf 4 (P) gegen SEE von Bergdoll (G), hauseig. SEA (H), SEA von Bergdoll (I) und KÜ von FRI 722 (J).

Kathodenseite: links

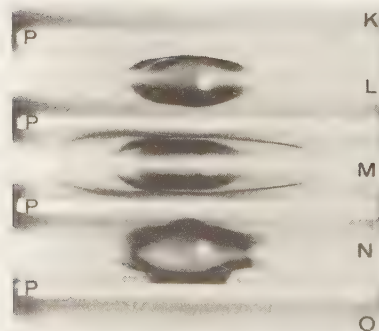


Abb. 7c:

Immunelektrophorese mit Serum von Schaf 4 (P) gegen SEE'B' (L), SEE Bergdoll (M) und SEE'A' (N).

Kathodenseite: links

Bei den Kontrollansätzen mit anti-SEC₁- bzw. anti-SED-Schafserum ergaben sich Präzipitationen nur mit dem homologen Enterotoxintyp und dem homologen Kulturüberstand (SEC). Bei dem anti-SEE-Serum von Schaf 3 wurden analoge Ergebnisse registriert.

3.3 Affinitätschromatographische Absorption des anti-SEE-Serums an SEA-Sepharose

Orientierende Versuche, das polyvalente anti-SEE-Serum durch Absorption und Absättigung mit Kulturüberständen (NOTERMANS et al., 1978; FEY, 1980) von den störenden Antikörperanteilen zu befreien, führten nicht zum gewünschten Erfolg. Deshalb wurde die Möglichkeit genutzt, allein die mit SEA kreuzreagierenden Antikörper (siehe 2.1.4) aus dem anti-SEE-Serum zu isolieren, um durch einen geeigneten Einsatz derselben im Sandwich-ELISA zum angestrebten spezifischen SEE-Nachweis zu gelangen (siehe 3.6.4).

3.3.1 Material

Zur Immobilisierung auf Sepharose standen 30 mg gereinigtes, lyophilisiertes SEA von Prof. Bergdoll zur Verfügung. Das SEA wies in der SDS-PAGE eine starke Bande bei ca. 30.000 D und eine schwache Bande bei ca. 60.000 D auf. Als Trägermatrix wurde aktivierte CH-Sepharose 4B (Pharmacia) gewählt. An Geräten wurden verwendet:

- Vakuumpumpe (Millipore),
 - Taumler (Heidolph),
 - Büchner-Trichter G 3, Saugflasche, Bechergläser,
 - Chromatographiesäule 1,0 x 40 cm, mit zwei Adaptoren, (Pharmacia),
 - Fraktionensammler,
 - Spektralphotometer (Beckman, Modell 25),
 - Vakuum-Rotationsverdampfer (Büchi, Rotavapor R 110).
- Laborchemikalien wurden in p.A. Qualität verwendet (Merck).

Als anti-SEE-Serum wurde im übrigen nur das von Schaf 4 verwendet.

3.3.2 Methodik

5 g Sepharose wurden in 1 mmol/l HCl suspendiert (1 g Sepharose ergibt 3 ml Gel) und in einem Büchnertrichter mit 1 l dieser HCl gewaschen (Entfernung von Konservierungszusätzen). Der Trichter wurde dazu auf eine Saugflasche gesetzt, an die über eine Vakuumpumpe ein Unterdruck von ca. 100 mm Hg gelegt wurde. Anschließend wurde die Sepharose mit der gleichen Menge Kopplungspuffer (0,1 mol/l NaHCO_3 mit 0,5 mol/l NaCl, pH 8,0) äquilibriert und in ein Becherglas überführt. Dann wurde das SEA (30 mg in 25 ml), das zuvor durch extensive Dialyse ebenfalls mit dem Kopplungspuffer äquilibriert worden war, zugegeben. Die Kopplung des Liganden (SEA) an die Matrix (Sepharose 4B) erfolgte während einer zweistündigen Inkubation auf dem Taumler bei Raumtemperatur. Vom Überstand wurde anschließend eine Probe entnommen, um den Gehalt an SEA zu bestimmen (ELISA). Nach Waschen der SEA-Sepharose mit Kopplungspuffer wurden noch vorhandene freie Bindungsstellen durch Inkubation der Sepharose mit 0,1 mol/l Tris-HCl mit 0,5 mol/l NaCl, pH 8,0 über eine Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Abschließend wurde die Matrix in drei Zyklen alternierend mit saurem und alkalischem Puffer (je 1,5 l 0,1 mol/l Acetattpuffer mit 0,5 mol/l NaCl bzw. o.a. Trispuffer) gewaschen. Sodann wurde mit der zuvor entgasten Matrix eine Säule gepackt (Flußrate: 19 ml/h). Das zu absorbierende anti-SEE-Schafserum wurde 1:8 mit dem Trispuffer verdünnt und mit 0,02 % NaN_3 versehen. Eingestellt auf ca. 10 mg/ml Protein passierten 286 ml anti-SEE-Schafserum mit 12 ml/h die Säule pro Lauf. Nach dem Spülen der Säule mit Trispuffer bis zum Erreichen der Basislinie, wurden die an SEA gebundenen Antikörper mit 0,1 mol/l Glycin-HCl mit 0,5 mol/l NaCl, pH 2,8 abdissoziiert und in Fraktionen zu 10,7 ml gesammelt. In Abbildung 8 sind Prinzip und Ablauf dieser Chromatographie

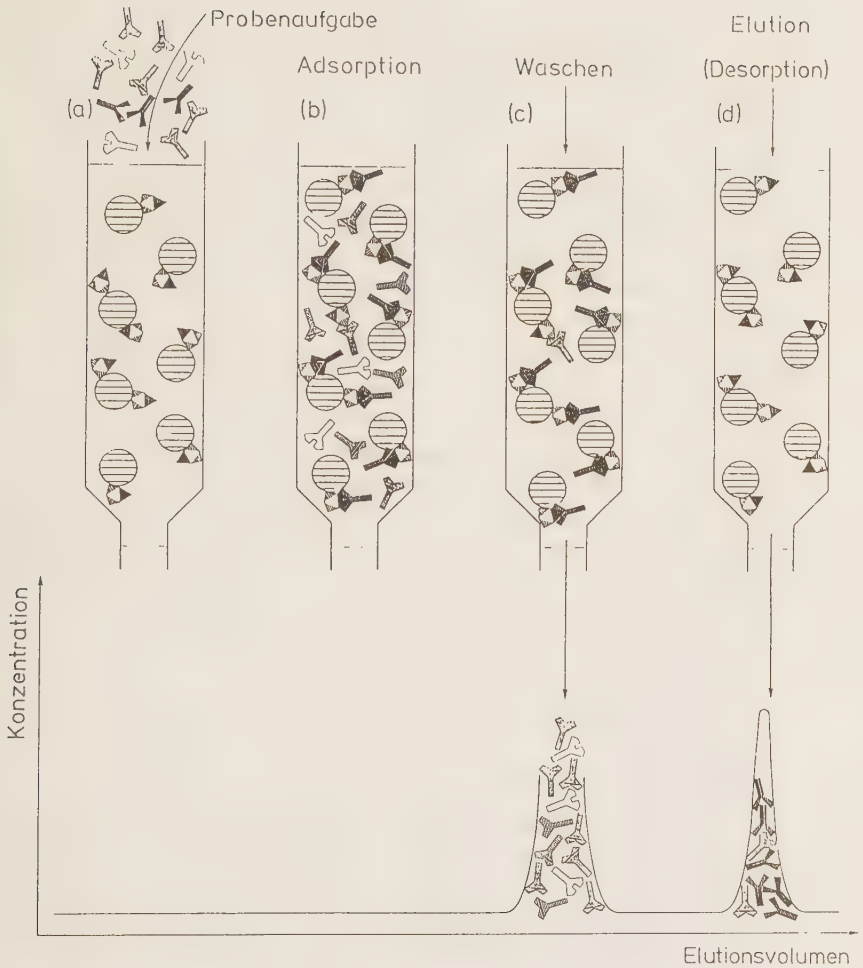


Abb.8: Affinitätschromatographische Isolierung von gemeinsamen SEE/A Antikörpern. (a) Die Säule enthält an die Matrix gebundenes SEA. a-SEE Serum mit SEE/A- und anderen Antikörpern wird aufgegeben. (b) Die SEE/A-Antikörper binden an das immobilisierte SEA. (c) Nicht gebundene Serumbestandteile werden durch Waschen entfernt. (d) Die SEE/A-Antikörper werden durch Änderung des pH-Wertes als scharfer Peak eluiert. (Legende s. S.54)

veranschaulicht. Die Graphik erfordert zum besseren Verständnis folgenden Hinweis: Es wurde absichtlich dargestellt, daß die aus der Säule mit SEA-Sepharose gewonnene Antikörperfraktion - wie später erkannt wurde - neben den Antikörpern, die gegen das gemeinsame Epitop von SEA und SEE gerichtet sind, in gewissem Umfang auch Antikörper, die gegen das spezifische Epitop von SEE gerichtet sind, enthält. Nicht berücksichtigt wurde, daß die isolierte Antikörperfraktion nicht ausschließlich aus IgG besteht, sondern auch geringe Mengen an Antikörpern aus anderen Antikörperklassen enthält. Aus diesem Grund werden sie im folgenden als SEE/A-Antikörper bezeichnet.

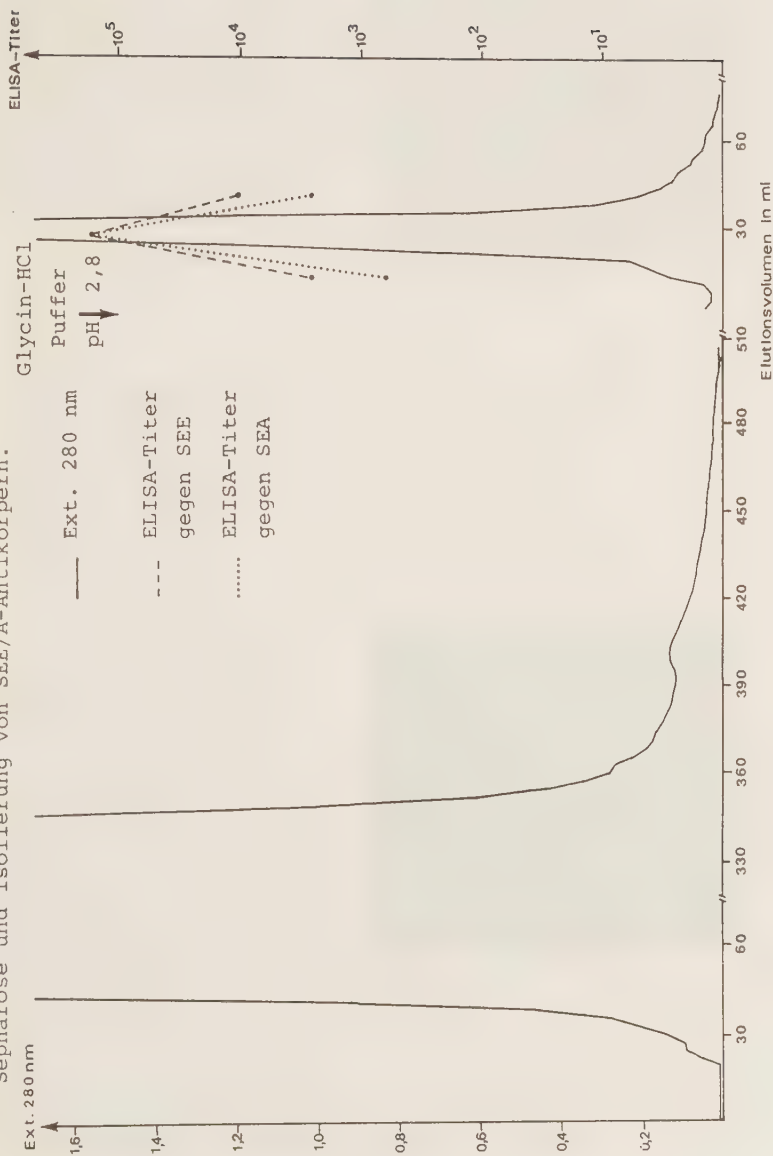
Das gegen SEA absorbierte Serum wurde nach Dialyse gegen entsprechend verdünnten Trispuffer im Rotationsverdampfer auf das Ausgangsvolumen eingengt. Das Eluat (SEE/A-Antikörper) wurde analog gegen PBS dialysiert und auf 1 ml eingengt. Das Serum und die isolierten Antikörper wurden in der Immunelektrophorese nach GRABAR und WILLIAMS (1953) gegen SEA und SEE eingesetzt, die Antikörper auch in Verdünnungsansätzen untersucht. Die Bindungsfähigkeit der isolierten Antikörper an SEA und SEE wurde zusätzlich im indirekten ELISA-Verfahren geprüft.

3.3.2 Ergebnisse

Im Überstand konnten nach der Kopplung nur noch 0,02 mg SEA nachgewiesen werden, so daß die Kopplungsrate bei der Anbindung des SEA an Sepharose über 99 % betrug.

In Abbildung 9 ist das Elutionsprofil eines Affinitätschromatographielaufes wiedergegeben. Die Menge der bei einem Lauf gewonnenen SEE/A-Antikörper betrug ca. 25 mg. In Abbildung 9 sind auch die im indirekten ELISA ermittelten Titer gegen SEE und SEA eingezeichnet. Sie waren gegen beide SE annähernd gleich hoch. In der Immunelektrophorese ergab das gegen SEA absorbierte Serum keine Präzipitation mehr mit SEA, nach wie vor aber noch mit dem Kulturüberstand von *S. aureus*-Stamm FRI 137 (Abb. 10a). Die isolierten

Abb. 9: Immunabsorption von anti-SEE-Schafserum durch Affinitätschromatographie an SEA-Sepharose und Isolierung von SEE/A-Antikörpern.



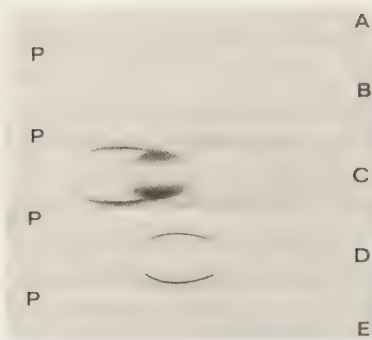


Abb. 10a:

Immunelektrophorese mit Serum von Schaf 4 (P) nach Absorption an SEA-Sephrose gegen SEA Bergdoll (B), KÜ von FRI 137 (C) und -Hämo-
lysin.

Kathodenseite: links

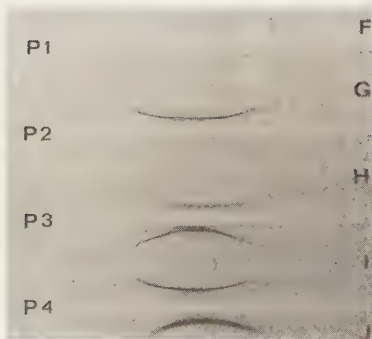


Abb. 10b:

Immunelektrophorese mit über SEA-Sephrose isolierten SEE/A-Antikörpern in unterschiedlichen Verdünnungen (P4 1:4, P3 1:8, P2 1:16, P1 1:32) gegen SEA Bergdoll (J, H, F) und SEE Bergdoll (I, G).

Kathodenseite: links

SEE/A-Antikörper präzipitierten mit SEE und SEA (Abb.10b). Die SEE/A-Antikörper präzipitierten jedoch mit SEE noch in Verdünnungen, in denen es zu keiner Präzipitation mit SEA mehr kam. Ein Vergleich der Abbildungen 10b und 7b (Seite 36 bzw. Seite 30) verdeutlicht den Unterschied in der Spezifität zwischen anti-SEE-Rohserum und SEE/A-Antikörpern bei der Reaktion mit SEE (Bergdoll): Eine einzige sichelförmige Präzipitation mit den SEE/A-Antikörpern gegenüber komplexen Präzipitationen beim Serum.

3.4 Isolierung von anti-SEE-Schaf-IgG

3.4.1 Material

Folgende Geräte und Reagenzien wurden verwendet:

- DEAE (Diethylaminoethyl)-Trisacryl M (LKB),
- Säule von 2,6 cm Durchmesser und 60 cm Länge (LKB),
- Fraktionensammler,
- Spektralphotometer (Beckman, Modell 25),
- anti-Schaf-Serum (DAKO), anti-Schaf-IgG (Cappel Laboratories) und Gamma-Globulin vom Schaf (Sigma),
- Laborchemikalien in p.A. Qualität (Merck).

3.4.2 Methodik

Das gegen SEA absorbierte anti-SEE Schafserum (3.3), eingestellt auf einen Proteingehalt von 3-4 %, wurde dreimal bei Raumtemperatur über vier Stunden mit 1,4 mol/l Ammoniumsulfat gefällt (nach HEBERT et al., 1973). Nach der letzten Fällung wurde das Zentrifugat in Puffer I (siehe Tabelle 1) gelöst und so lange gegen Puffer I dialysiert, bis im Außendialysat mit der Bariumchloridprobe kein Sulfat mehr nachgewiesen werden konnte. Durch entsprechende Verdünnung mit Puffer I wurde die Proteinkonzentration der Ig-Rohfraktion auf 2,5 % eingestellt. Mit gegen Puffer I äquilibriertem DEAE-Trisacryl M wurde eine Säule gepackt, auf die 18 ml der Ig-Rohfraktion aufgegeben wurden. Bei einer Flußrate von

19 ml/h wurde mit einem gestuften Puffergradienten (Tabelle 1) in Fraktionen zu 3,7 ml eluiert. Nach dem Poolen bestimmter Fraktionen wurden Proben aus den Pools in der Immunelektrophorese nach GRABAR und WILLIAMS (1953) auf ihren Gehalt an IgG bzw. Serumproteinen untersucht. In diese Analyse wurden auch die SEE/A-Antikörper aus 3.3 einbezogen. Als Standard wurde eine Schaf-Gamma-Globulin-Präparation mitgeführt. Mit Hilfe der SDS-PAGE (Einzelheiten siehe

Tabelle 1: Tris-HCl-Puffergradient zur Isolierung von anti-SEE-Schaf IgG mittels Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Trisacryl M

Puffer	I	II	III*
Tris-HCl	0.025 mol/l	0,025 mol/l	0,1 mol/l
NaCl	0,035 mol/l	0,075 mol/l	1,0 mol/l
NaN ₃	0,02 %	0,02 %	0,02 %
pH-Wert	8,8	8,5	8,8

* Regenerationspuffer

3.7.3) wurden die Fraktionen auf ihre Homogenität hinsichtlich des Molekulargewichts geprüft.

3.4.3 Ergebnisse

Aus dem gefällten, zuvor gegen SEA absorbierten anti-SEE-Serum konnten durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-

Trisacryl M die vier Fraktionen I, IIa, IIb und III isoliert werden (Abbildung 11). Die Abbildungen 12a,b,c zeigen die immunoelektrophoretische Analyse der Fraktionen I bis III sowie der SEE/A-Antikörper. Die Proteine der Fraktion I zeigen ein Wanderungsverhalten wie der stärker elektropositive Teil der Schaf-Gamma-Globulin Fraktion und stellen IgG₂ dar. Die Fraktionen IIa und IIb wandern ebenfalls wie Gamma-Globulin, sind aber weniger elektropositiv und stellen IgG₁ dar. Fraktion III enthält neben IgG-Anteilen die übrigen Serumproteine. Die SEE/A-Antikörper glichen in ihrem Wanderungsverhalten dem Gamma-Globulin vom Schaf. In der SDS-PAGE wiesen die Fraktionen I, IIa und IIb eine einzige Bande auf. Die Fraktion III und die SEE/A-Antikörper zeigten neben einer Hauptbande weitere, zum Teil sehr schwache Banden (siehe Abb. 13).

3.5 Enzymmarkierung von anti-SEE-Schaf IgG und SEE/A-Antikörpern

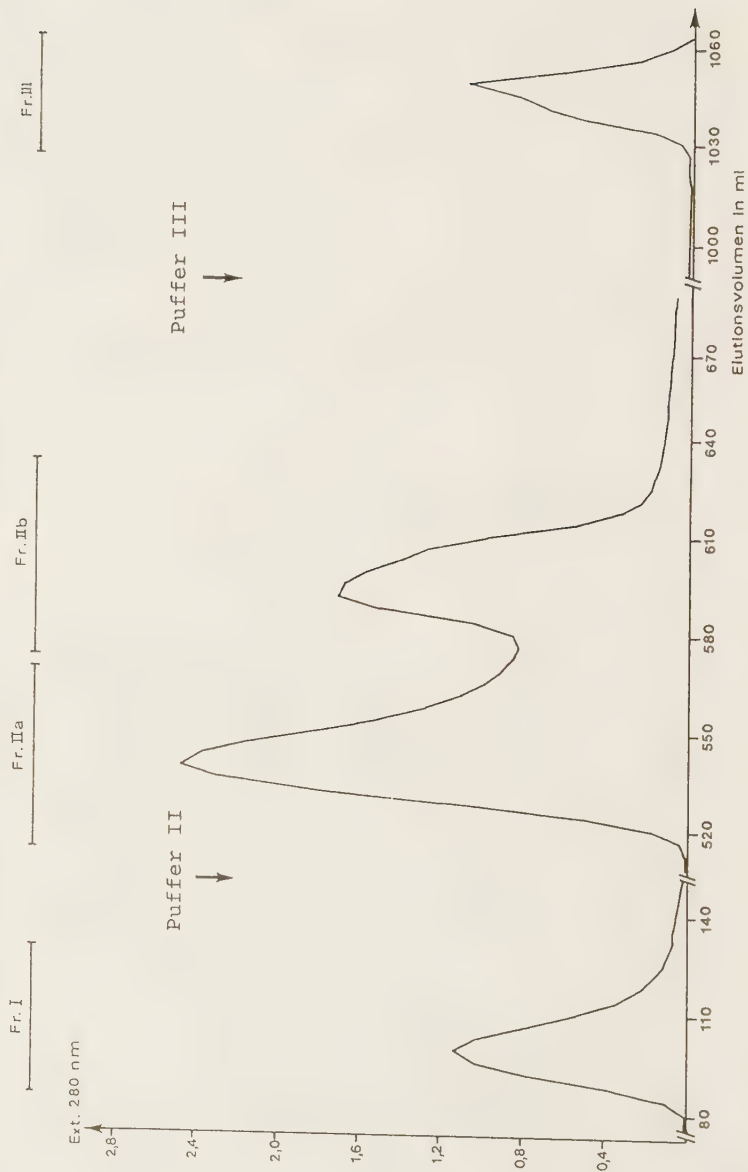
3.5.1 Material

Zur Herstellung des Enzym-Antikörper-Konjugates wurden Meerrettichperoxidase (Boehringer, 413470), Natrium-Perjodat (Sigma), Natrium-Borohydrid (Sigma) und die in 3.3 bzw. 3.4 gewonnenen SEE/A-Antikörper bzw. die IgG₁-Fraktion IIa verwendet. Bei dem bovinen Serumalbumin (BSA) handelte es sich um ein Produkt der Firma Sigma. Die übrigen Chemikalien stammten von der Firma Merck (p.A. Qualität). Zur Gelfiltration wurde Sephacryl S-200 superfine (Pharmacia) eingesetzt. Die Packung der Säule wurde mit Cytochrom C (Serva, 18020) überprüft.

Als Eichproteine dienten:

γ-Globulin aus Kaninchenserum (Serva, 22540)	MG 150.000 D
Albumin aus Rinderserum (Serva, 11920)	MG 67.000 D
Albumin aus Hühnerei (Serva, 11840)	MG 45.000 D
Chymotrypsin A (Serva, 17200)	MG 25.000 D

Abb. 11: Ionenaustauschchromatographie einer anti-SEE-Schaf Ig-Rohfraktion



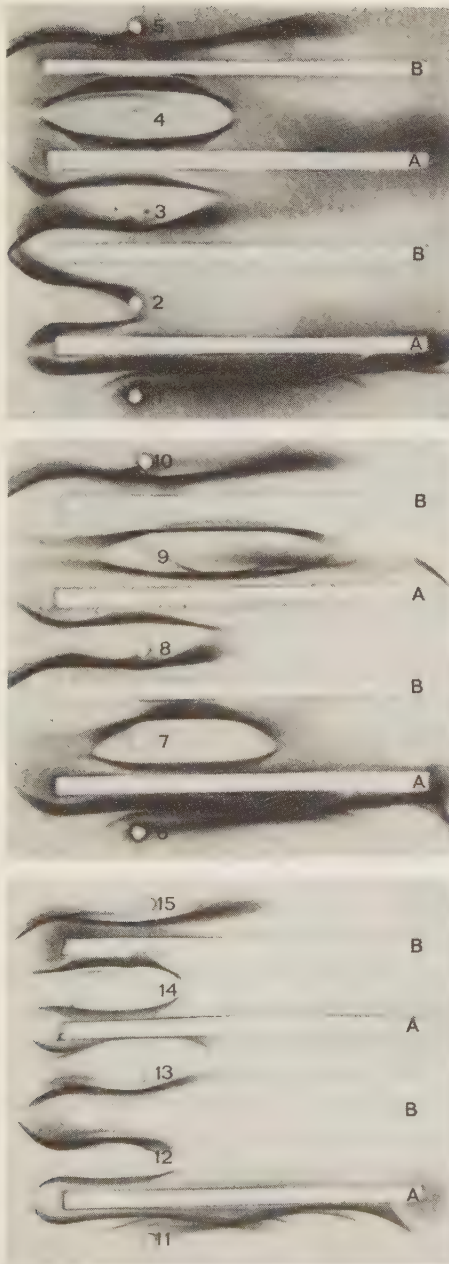


Abb. 12 a,b,c:

Immunoelektrophoretische Analyse von Schafserumproteinfraktionen nach Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Trisacryl M sowie von SEE/A-Antikörpern isoliert aus SEA-Sephrose.

A: anti-Schaf-Serum

B: anti-Schaf-IgG

1: anti-SEE-Schafserum

2: Fraktion I

3: Schaf IgG (Sigma)

4: Fraktion IIa

5: anti-SEE-Schafserum

6: anti-SEE-Schafserum

7: Fraktion IIb

8: Schaf IgG (Sigma)

9: Fraktion III

10: anti-SEE-Schafserum

11: anti-SEE-Schafserum

12: Schaf IgG (Sigma)

13: SEE/A-Antikörper

14: Fraktion IIa

15: anti-SEE-Schafserum

Kathodenseite: links

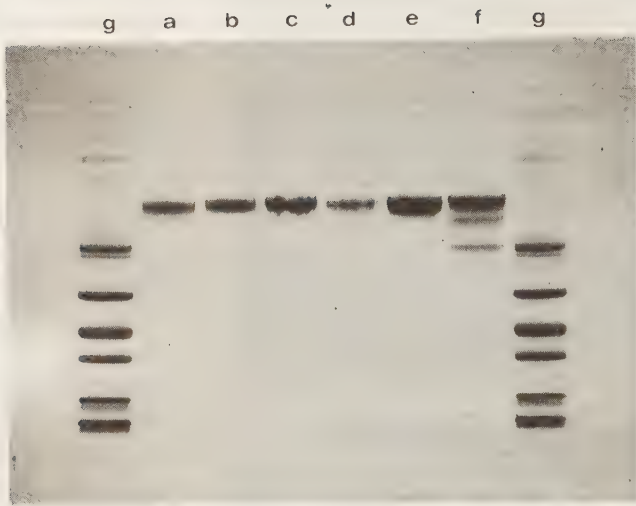


Abb. 13: SDS-Gelelektrophorese von Schafserumproteinfraktionen

SDS-Gelelektrophorese in ultradünnem Polyacrylamidgel mit linearem Porengradienten

(T = 7,5-22,5 %; C = 3 %)

- a) Fraktion I
- b) Fraktion IIa
- c) Fraktion IIb
- d) Fraktion III
- e) Schaf IgG (Sigma)
- f) SEE/A-Antikörper
- g) Eichproteine mit Molgewicht in Dalton, von oben nach unten: Phosphorylase b, 94.000; Rinderse-
rumalbumin, 67.000; Eialbumin, 43.000; Carboan-
hydrase, 30.000; Trypsininhibitor, 20.100;
 α -Lactalbumin, 14.400.

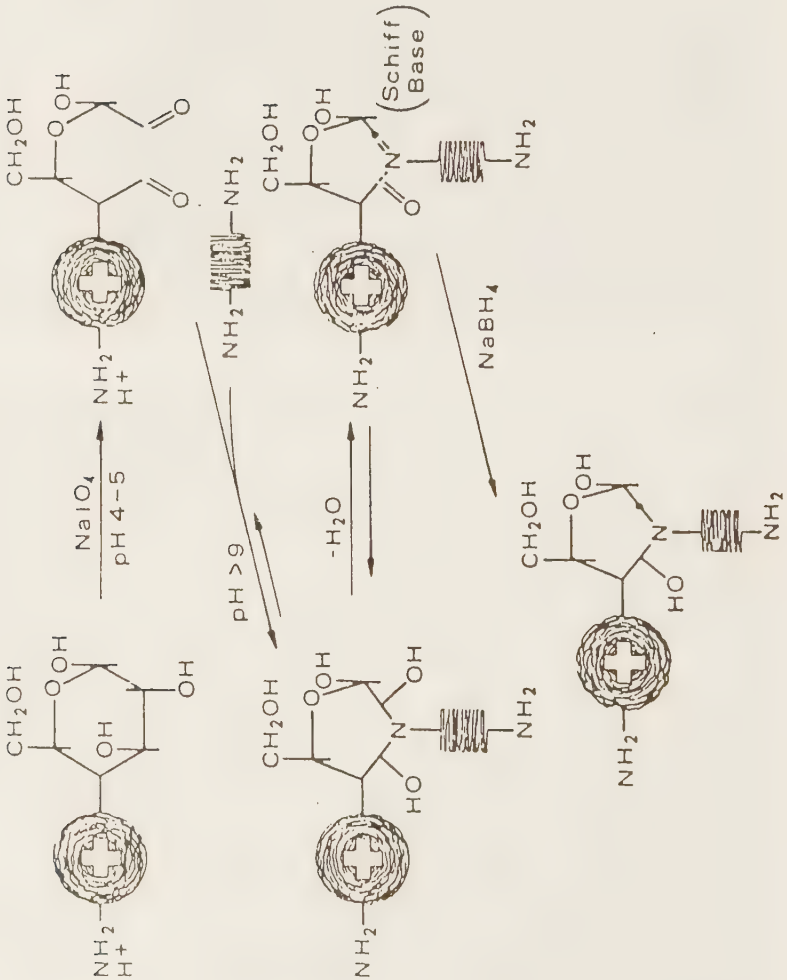
3.5.2 Methodik

Die Kopplung wurde nach der Methode von WILSON und NAKANE (1978) durchgeführt (Abb. 14).

Es wurden 4 mg Meerrettichperoxidase (HRP) in 1 ml Aqua dest. gelöst, 0,2 ml frisch angesetzter 0,1 mol/l Natrium-Perjodatlösung zugegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt (Farbumschlag nach grün!). Die entstandene HRP-Aldehydlösung wurde anschließend über Nacht bei 4 °C gegen 1 mmol/l Natriumacetatpuffer, pH 4,4 dialysiert. Durch Zusatz von 0,02 ml 0,2 mol/l Natriumcarbonatpuffer, pH 9,5 wurde der pH Wert auf 9 - 9,5 angehoben und durch sofortige Zugabe von 8 mg anti-SEE-IgG bzw. SEE/A-Antikörper (in 0,01 mol/l Natriumcarbonatpuffer, pH 9,5) die Kopplung gestartet. Das Kopplungsgemisch wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurden durch zweistündige Einwirkung (4 °C) von 0,1 ml frisch angesetzter 0,11 mol/l Natrium-Borohydridlösung die Schiff'schen Basen stabilisiert.

Da das Reaktionsgemisch neben dem Kopplungsprodukt auch ungebundene Immunglobuline und HRP-Aldehyd enthält, wurden die einzelnen Komponenten durch Gelchromatographie voneinander getrennt. Dazu wurde eine Säule mit Sephacryl S-200 superfine gepackt und mit PBS, pH 7,2 äquilibriert. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden dann je 5 mg Eichprotein in insgesamt 1 ml PBS gelöst auf die Säule aufgetragen, mit einer Flußrate von 10 ml/h eluiert und in Fraktionen zu 5,7 ml gesammelt. Unter den gleichen Bedingungen wurde das Reaktionsgemisch über die Säule aufgetrennt. Der Gesamtproteingehalt (bei 280 nm) und der HRP-Gehalt (bei 403 nm) der einzelnen Fraktionen wurden im Spektralphotometer gemessen und die jeweilige Reinheitszahl (RZ), die zur Bestimmung des Enzym-Antikörper-Konjugates herangezogen wird (WILSON und NAKANE, 1978) anhand des Quotienten $E_{403 \text{ nm}} : E_{280 \text{ nm}}$ berechnet. Um eine geeignete Portionierung der Konjugate vornehmen zu können, wurde unmittelbar darauf ihre adäquate Gebrauchsverdünnung beim Einsatz im Sandwich-ELISA ermittelt (siehe 3.6).

Abb. 14: Reaktionsablauf bei der Kopplung von HRP an Protein
(nach WILSON und NAKANE, 1978)



3.5.3 Ergebnisse

Die bei der Auftrennung der Reaktionsgemische erhaltenen Elutionsprofile sind in den Abbildungen 15 und 16 aufgezeigt. Das Eluat der Fraktionen 42 bis 48 wies jeweils ein Molekulargewicht von ca. 200.000 D auf und enthielt enzymmarkierte anti-SEE-Immunglobuline bzw. SEE/A-Antikörper. In den Fraktionen 49 bis 58 war überwiegend Material mit einem Molekulargewicht von ca. 150.000 D vorhanden (nichtmarkierte Immunglobuline), in den Fraktionen 68 - 74 solches mit einem Molekulargewicht von ca. 40.000 D (freie HRP). Die Eluate mit einem RZ-Wert zwischen 0,4 und 0,5 (Fraktionen 42 - 48) wurden jeweils gepoolt, mit 10 mg/ml BSA versetzt und bei -80 °C gelagert.

Für die Anwendung beider Konjugate im Sandwich-ELISA wurde, in Kombination mit einer Beschichtungskonzentration von 20 µg/ml anti-SEE-IgG (siehe 3.6), eine Gebrauchsverdünnung von 1:1000 für das Konjugat aus anti-SEE-IgG bzw. von 1:5000 für das Konjugat aus SEE/A-Antikörpern bei zehn Minuten Substratinkubation als günstig ermittelt.

3.6 Erstellung eines Sandwich-ELISA zum spezifischen Nachweis von SEE

3.6.1 Material

Folgende Geräte, Reagenzien und Lösungen wurden zur Durchführung des Sandwich-ELISA eingesetzt:

- Polystyrol-Mikrotiterplatten (Nunc, Immunoplatte IF mit Prüfzertifikat),
- 12-Kanalpipette (Dynatech),
- Metallkassette als feuchte Kammer (Blickle),
- 8-Kanalwaschgerät (Dynatech, Miniwash),
- Taumelgerät (Heidolph),
- Micro-ELISA Autoreader (Dynatech),
- Tween 20 (Sigma),
- anti-SEE-Schaf IgG (siehe 3.4),

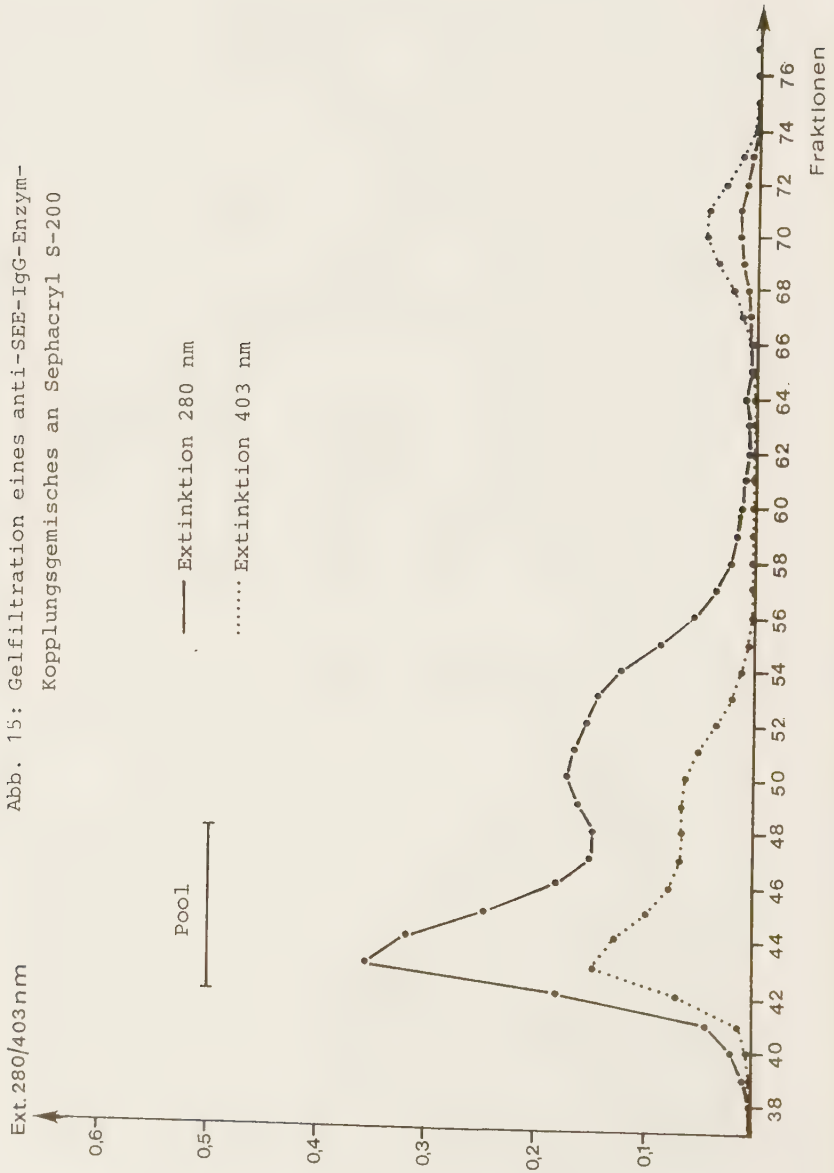
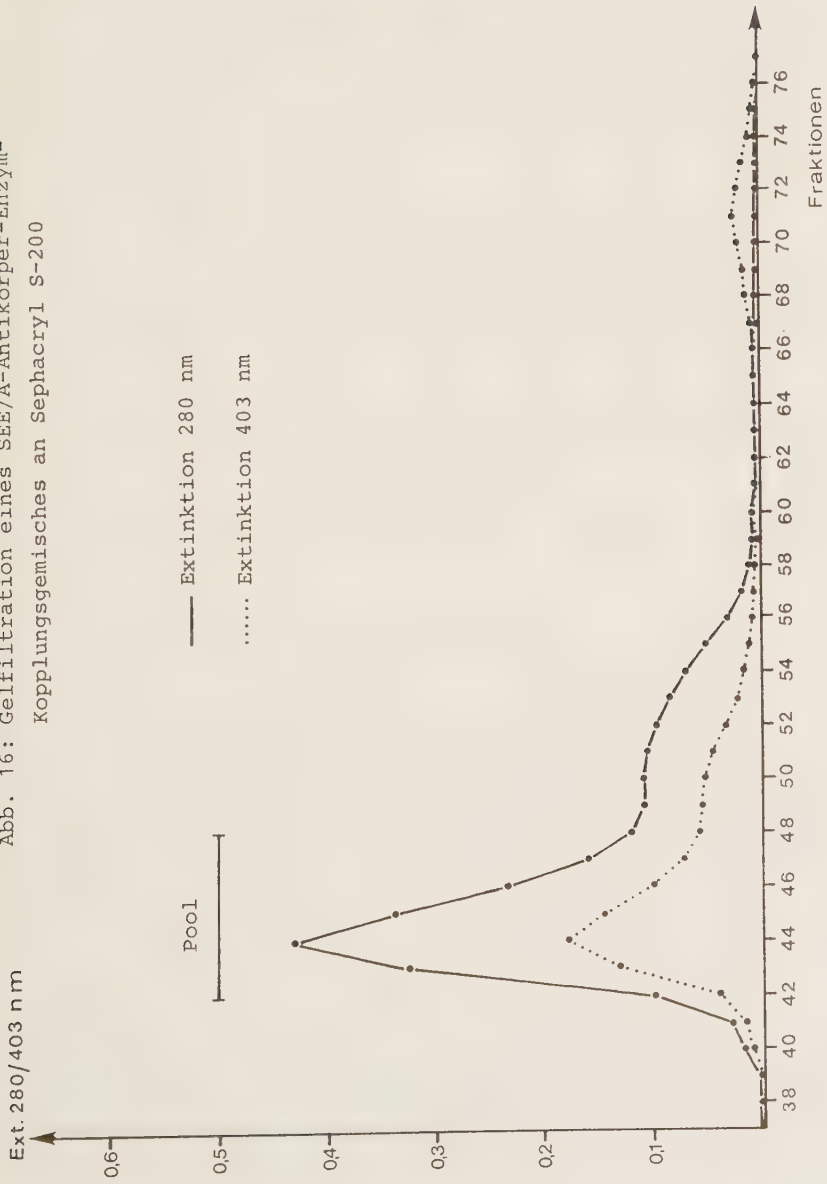


Abb. 16: Gelfiltration eines SEE/A-Antikörper-Enzym-Kopplungsgemisches an Sephacryl S-200



- SEE/A-Antikörper (siehe 3.3),
- SEE, gereinigt (siehe 3.1 und 3.7),
- anti-SEE-HRP und anti-SEE/A-HRP (siehe 3.5),
- Beschichtungspuffer: PBS, pH 7,2,
- Puffer zur Absättigung freier Bindungsstellen: 0,1 % BSA in PBS, pH 7,2,
- Waschlösung: 0,15 mol/l NaCl mit 0,05 % Tween 20,
- H_2O_2 , 30%ig, stabilisiert (Merck),
- 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) (Sigma),
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma),
- TMB-Lösung: 10 mg TMB pro ml DMSO,
- Substratpuffer: 0,1 mol /l Natriumacetat/Citratpuffer, pH 6,0,
- Stopplösung: 2 mol/l H_2SO_4 ,
- Laborchemikalien in p.A. Qualität (Merck).

3.6.2 Herstellung des Immunosorbens

3.6.2.1 Methodik

Zur Bestimmung der optimalen IgG Konzentration für die Beschichtung der Mikrotiterplatten wurde folgende Versuchsanordnung gewählt:

Über die zwölf mal acht Kavitäten zweier Mikrotiterplatten, in die je 0,1 ml PBS vorgelegt worden waren, wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe über zwölf Stufen, beginnend bei 100 μ g/ml und endend bei 48,8 ng/ml anti-SEE-Schaf IgG, angelegt. Die Platten wurden drei Stunden bei 37 °C und anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert und eine halbe Stunde lang mit BSA/PBS abgesättigt. Nach zweimaligem Waschen wurden die Platten pro Verdünnungsstufe in Dreifachansätzen mit 100, 50, 10 und 5 ng/ml SEE (0,1 ml/Kavität) beschickt und 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Taumler inkubiert. Als Nullwert diente pro Beschichtungsansatz und Platte ein Doppelansatz mit PBS. Nach erneutem zweimaligem Waschen wurden beide Platten nach der Zugabe von Konjugat (anti-SEE-HRP 1:1000) 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Taumler inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen wurde Substratlösung nach BOS et al. (1981) (1 Teil TMB-Lösung plus 100 Teile Substratpuffer plus 1,3 mmol/l H_2O_2), 0,1 ml pro Kavität, zugegeben und die Reaktion nach zehn Minuten mit 0,05 ml 2 mol/l H_2SO_4 pro Kavität gestoppt. Der Nachweis gebundener Enzymaktivität erfolgte durch Messung der Extinktion bei 450 nm.

3.6.2.2 Ergebnisse

Wie aus Abbildung 17 hervorgeht, bindet sich das Enzymkonjugat bei einer Beschichtungskonzentration von ca. 20 $\mu\text{g/ml}$ anti-SEE-IgG und darüber am besten. Bei keiner der eingesetzten SEE-Konzentrationen kann durch eine Erhöhung der Beschichtungskonzentration über 20 $\mu\text{g/ml}$ eine Zunahme der Konjugatbindung erreicht werden. Eine Abnahme der Konjugatbindung ist in diesen Bereichen ebenfalls nicht zu verzeichnen. Aufgrund dieses Ergebnisses wird im folgenden beim Sandwich-ELISA zum Nachweis von SEE mit einer Beschichtungskonzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ anti-SEE-IgG gearbeitet.

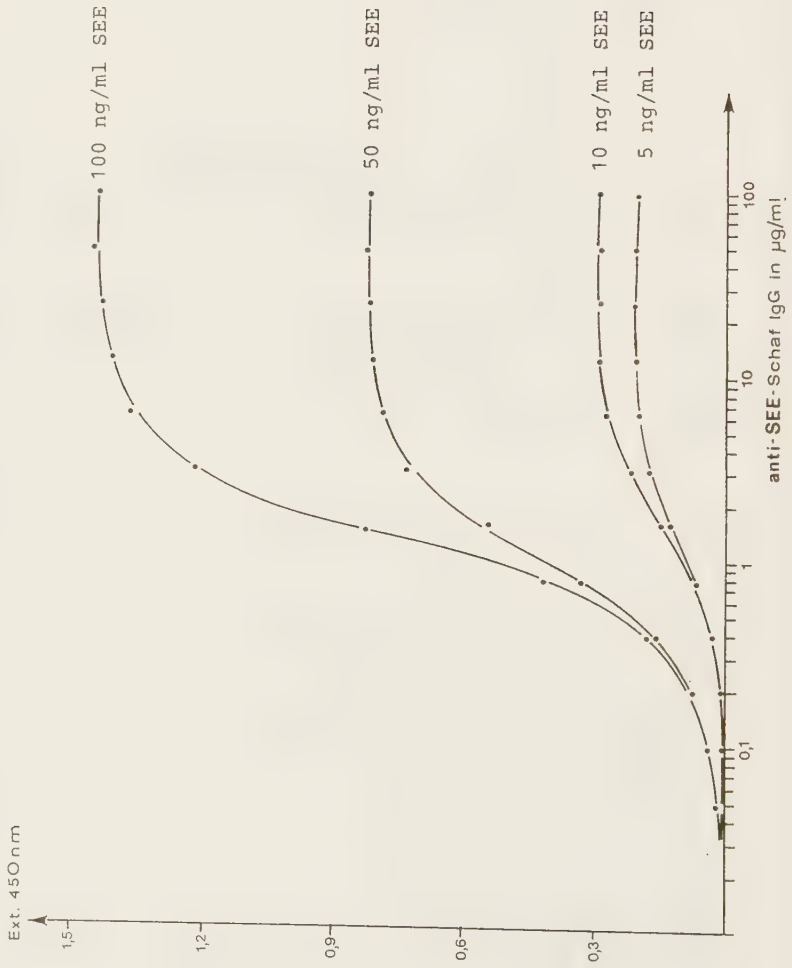
3.6.3 Optimierung der Enzymbestimmung

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin wurde außer von BOS et al. (1981) auch von GALLATI und PRACHT (1985) als Substrat für Meerrettichperoxidase empfohlen, da es eine starke bei 450 nm zu messende Farbintensität liefert. Von den genannten Autoren wurden aber unterschiedliche Rezepturen für TMB-Substratlösungen entwickelt, die vergleichend auf ihre Eignung geprüft werden sollten.

3.6.3.1 Methodik

Entsprechend der Rezeptur nach BOS et al. (1981) wurden 10,01 mg TMB pro ml DMSO gelöst. Als Substratpuffer wurde ein 0,1 mol/l Natriumacetat/Citratpuffer, pH 6,0 verwendet. Stammlösung und Substratpuffer sind bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluß mehrere Wochen haltbar. Unmittelbar vor

Abb. 17: Bindungsvermögen des Enzymkonjugates in Abhängigkeit von der Beschichtungskonzentration



dem Gebrauch wurde die Substratlösung aus einem Teil TMB-Lösung und 100 Teilen Substratpuffer unter Zugabe von 1,3 mmol/l H_2O_2 hergestellt. Das Abstoppen der Substratreaktion erfolgte mit 0,05 ml 2 mol/l H_2SO_4 pro 0,1 ml Substratlösung.

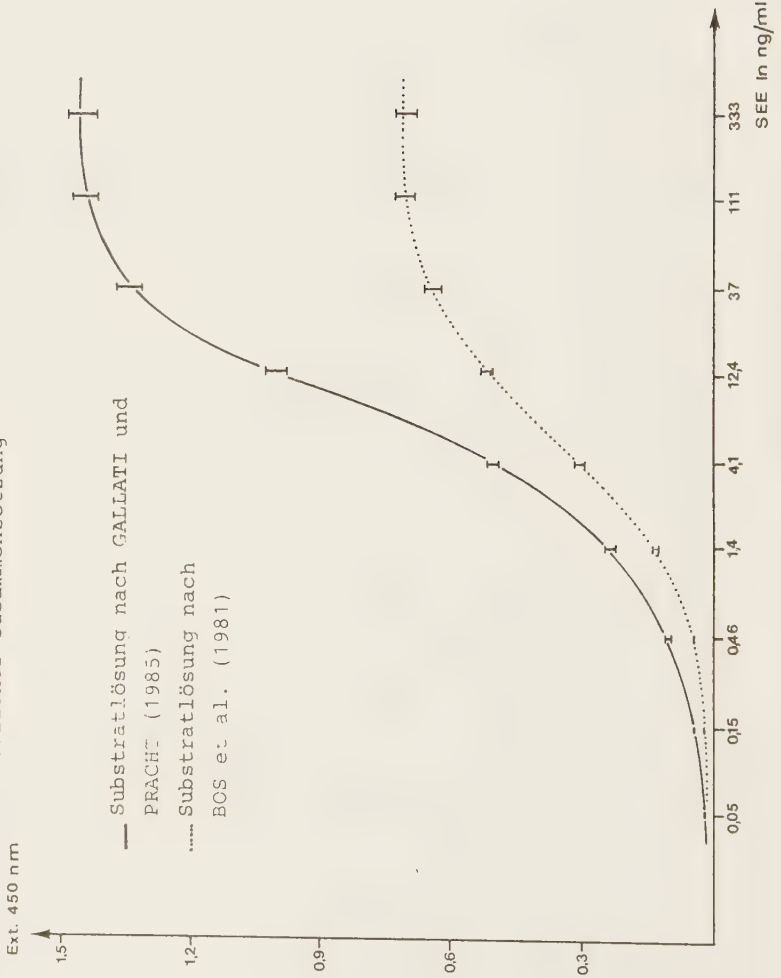
Nach GALLATI und PRACHT (1985) wurden 5,04 mg TMB pro ml eines Gemisches aus einem Teil Aceton und neun Teilen Methanol gelöst. Als Substratpuffer wurde 0,21 mol/l Citratpuffer verwendet, der mit 1 mol/l KOH auf pH 3,9-4,0 eingestellt wurde und dem 3,15 mmol/l H_2O_2 zugesetzt wurden. TMB-Lösung und Substratpuffer sind ebenfalls bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluß mehrere Wochen lang haltbar. Vor dem Gebrauch wurde die Substratlösung aus einem Teil TMB-Lösung und 20 Teilen Substratpuffer hergestellt. Das Stoppen der Substratreaktion erfolgte mit 0,1 ml 1 mol/l H_2SO_4 pro 0,1 ml Substratlösung.

Das ELISA-Verfahren wurde wie unter 3.6.2 beschrieben durchgeführt. Verglichen wurden die Substratlösungen an den Standardkurven für den Nachweis von SEE, wobei in jeder Verdünnungsstufe vier Parallelwerte angelegt wurden.

3.6.3.2 Ergebnisse

Die Farbintensität im ELISA war unter gleichen Bedingungen bei Verwendung der Rezeptur nach GALLATI und PRACHT (1985) stärker (siehe Abbildung 18) als bei Verwendung der Rezeptur nach BOS et al. (1981). Bei letzterer wäre eine längere Inkubationszeit erforderlich, um eine vergleichbare Nachweisempfindlichkeit zu erzielen. Im Interesse eines raschen Nachweises wurde in den weiteren Versuchen die Substratlösung nach GALLATI und PRACHT (1985) eingesetzt.

Abb. 13: Messung der enzymatischen Aktivität mit Substratlösungen unterschiedlicher Zusammensetzung



3.6.4 Prüfung dreier Sandwich-ELISA-Varianten auf ihre Eignung zum spezifischen Nachweis von SEE

3.6.4.1 Material

Die eingesetzten gereinigten Staphylokokken-Enterotoxine SEA, SEB, SEC₁, SED und SEE stammten alle aus hauseigener Produktion, die Kulturüberstände (Tabelle 2) von in der Stammsammlung vorhandenen *S. aureus* Stämmen. Diese wurden von Schrägagar in BHI überimpft und 48 Stunden bei 37 °C inkubiert (Schüttelkultur). Anschließend wurden durch Zentrifugieren bei 18.000 g über 20 Minuten die Kulturüberstände gewonnen.

3.6.4.2 Methodik

Mit den nach 3.3 und 3.4 gewonnenen Antikörperfraktionen und den damit hergestellten Enzymkonjugaten wurden durch Kombination drei Sandwich-ELISA-Varianten erstellt und auf ihre Praktikabilität und Eignung zum spezifischen SEE-Nachweis geprüft.

Bei der ELISA-Variante 1 wurde die IgG₁-Fraktion des gegen SEA absorbierten anti-SEE-Serums verwendet und mit einem ebenfalls aus dieser Fraktion hergestellten HRP-Konjugat kombiniert (Tab. 3). Wie Abbildung 19 zeigt, sind bei diesem bisher zum SE-Nachweis angewandten Modell (LINZ, 1983; SCHREINER, 1985) falschpositive Reaktionen mit Staphylokokken-Exoprotein nicht auszuschließen.

Bei der ELISA-Variante 2 wurde die SEE/A-Antikörperfraktion als Festkörperphase in Verbindung mit dem Konjugat von Variante 1 verwendet (Tab. 3). Diese Variante sollte einen spezifischen Nachweis von SEE ermöglichen, weil die Festkörperphase nur SEE und SEA bindet, sonstige Probenbestandteile beim Waschschrift entfernt werden und das Konjugat aus gegen SEA absorbiertem Material nur noch mit dem gebundenem SEE reagieren kann (Abbildung 20). Ein solcher Sandwich-ELISA

Legende zu den in den Abbildungen verwendeten Zeichen:



anti-SEE-IgG,
gegen das spezifische Epitop von SEE gerichtet



SEE



SEE/A-Antikörper,
gegen das gemeinsame Epitop von SEA und SEE
gerichtet



SEA



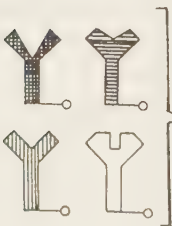
anti-SEA-IgG,
gegen das spezifische Epitop von SEA gerichtet



sonstiges Antigen



IgG,
gegen sonstige Antigene gerichtet



IgG und Antikörper,
mit Peroxidase markiert

Abb. 19: Sandwich-ELISA-Variante 1
Festkörperphase und Konjugat aus gegen SEA
absorbiertem anti-SEE-IgG
(Legende s. S. 54)

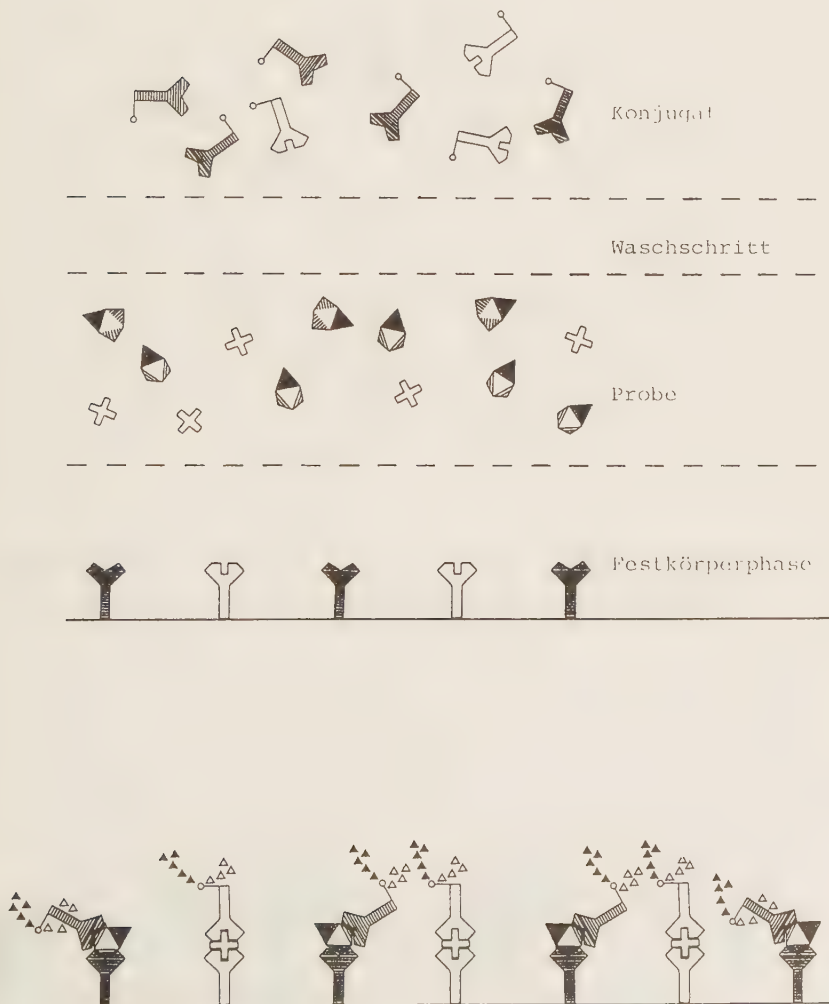


Abb. 20: Sandwich-ELISA-Variante 2

Festkörperphase aus SEE/A-Antikörpern und
Konjugat aus gegen SEA absorbiertem anti-SEA-IgG
(Legende s. S. 54)

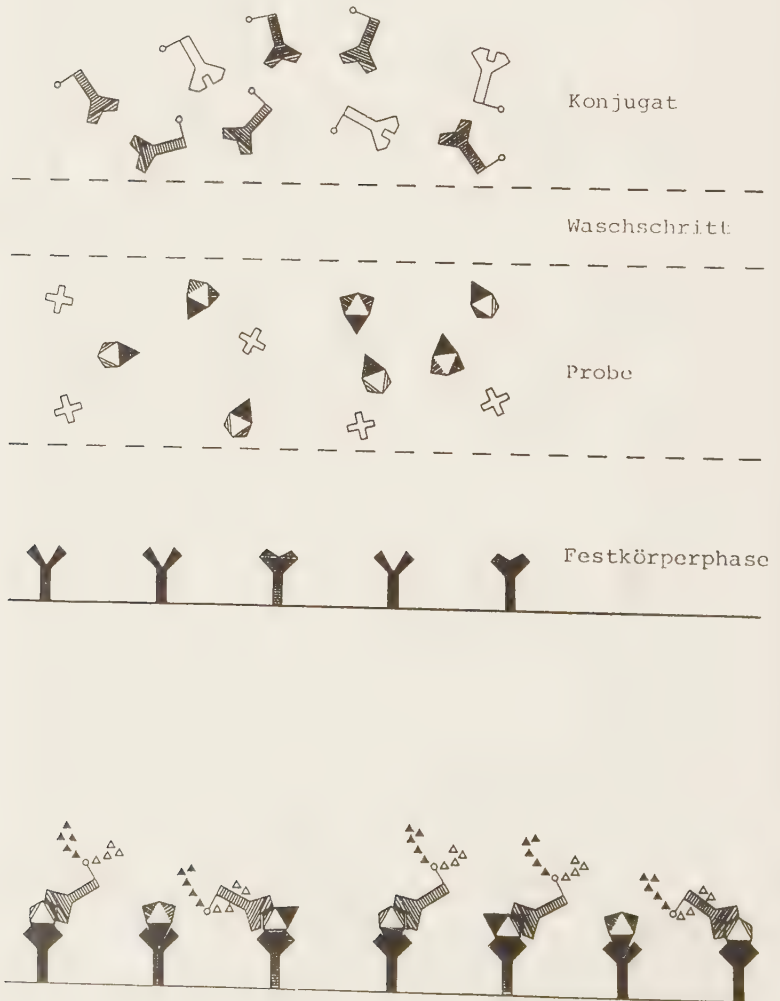


Abb. 21: Sandwich-ELISA-Variante 3

Festkörperphase aus gegen SEA absorbiertem anti-
SEE-IgG und Konjugat aus SEE/A-Antikörpern
(Legende s. S. 54)

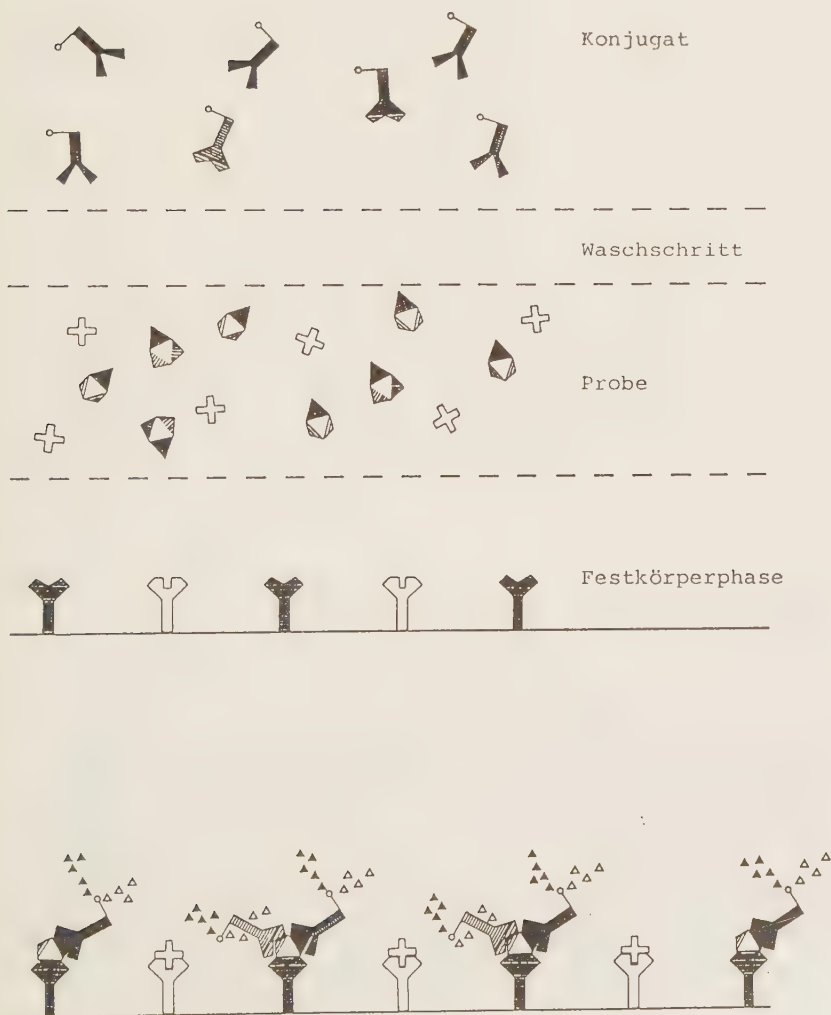


Tabelle 2: Im Sandwich-ELISA untersuchte *S. aureus*-Stämme und gereinigte SE

Code-Nr.	<i>S. aureus</i> -Stamm	Enterotoxine
1	13N-2909 (A)	-
2	722 (A)	-
3	10-275 (B)	-
4	243 (B)	-
5	901 (B)	-
6	137 (C ₁)	-
7	493 (C ₂)	-
8	361 (C ₂)	-
9	1151m (D)	-
10	326 (E)	-
11	920 (E)	-
12	184	-
13	20-272	-
14	Kontrolle (BHI)	-
15	-	SEA
16	-	SEB
17	-	SEC ₁
18	-	SED
19	-	SEE

zum Nachweis von SEE, unter Verwendung monoklonaler Antikörper, wurde von THOMPSON et al. (1986) beschrieben.

Bei der ELISA-Variante 3 (Tab. 3) wurde die IgG₁-Fraktion des gegen SEA absorbierten Serums als Festkörperphase eingesetzt, aber mit dem HRP-Konjugat aus SEE/A-Antikörpern kombiniert (Abbildung 21). Diese Variante sollte gleichfalls einen spezifischen SEE-Nachweis ermöglichen. da die Festkörperphase nur SEE und eventuell auch andere Antigene, jedoch

kein SEA bindet, so daß das Konjugat nur mit dem gebundenen SEE reagieren kann.

Tabelle 3: Herstellung verschiedener ELISA-Varianten mit anti-SEE-Schaf IgG bzw. SEE/A-Antikörpern und den entsprechenden Enzymkonjugaten.

ELISA-Variante	Festkörperphase	Konjugat
1	anti-SEE-Schaf IgG	anti-SEE-HRP
2	SEE/A-Antikörper	anti-SEE-HRP
3	anti-SEE-Schaf IgG	anti-SEE/A-HRP

Die gereinigten Enterotoxine wurden in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ (PBS), die Kulturüberstände unverdünnt eingesetzt. Alle Proben wurden im Dreifachansatz untersucht. Als Negativkontrolle bei den Kulturüberständen diente unbeimpftes Kulturmedium. Die Durchführung des ELISA erfolgte wie unter 3.6.2 beschrieben.

3.6.4.3 Ergebnisse

Die mit der SEE-ELISA-Variante 1 erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt. Von den eingesetzten gereinigten Enterotoxinen reagierte nur das gereinigte SEE (Nr. 19). Von den untersuchten Kulturüberständen reagierten die mit Nr. 10 und Nr. 11 codierten Proben (SEE-Bildner) zwar am stärksten positiv, doch waren außer bei den SEC-Bildnern (Nummern 6, 7 und 8) bei allen anderen getesteten Kulturüberständen ebenfalls eindeutig positive Reaktionen zu verzeichnen (Leerwert Nr.14).

Bei der ELISA-Variante 2 (Abbildung 23) war bei den Nummern 10, 11 (SEE-Kulturüberstände) und 19 (gereinigtes SEE) eine stark positive, bei der Nr. 3 (SEB-Kulturüberstand) eine schwach positive Reaktion zu registrieren (Leerwert:

Abb. 22: Untersuchung von Kulturüberständen und geringigten Enterotoxinen mit
Sandwich-ELISA-Variante 1

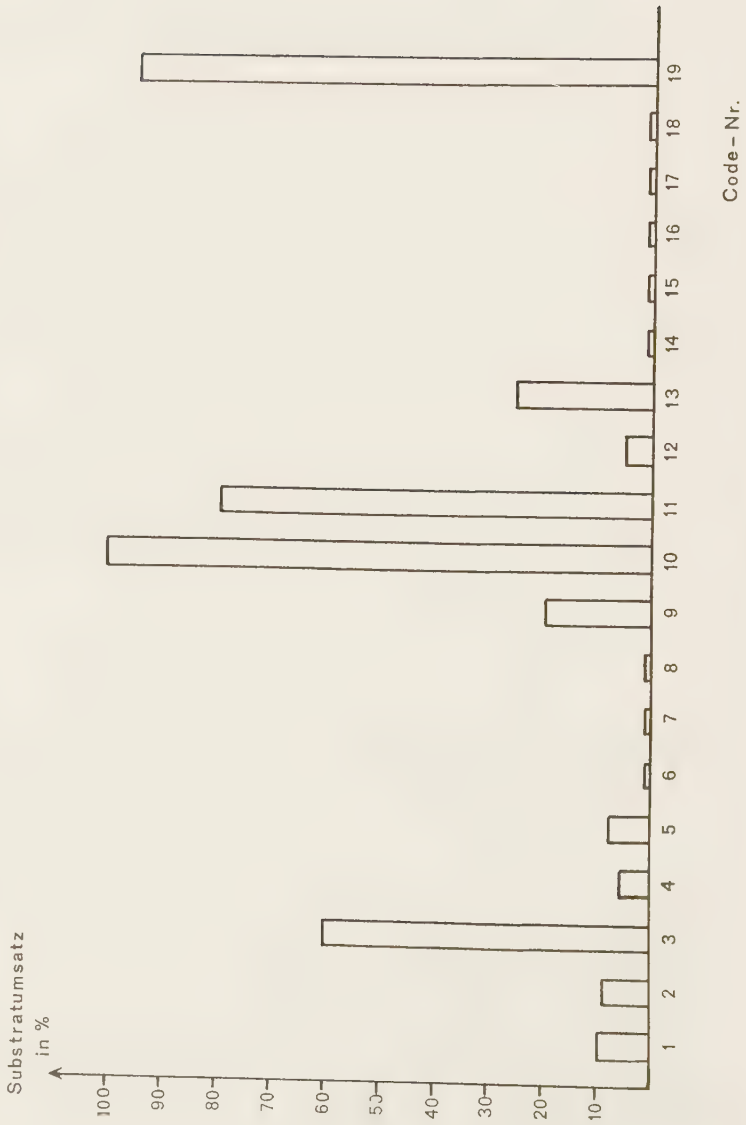


Abb. 23: Untersuchung von Kulturüberständen und gereinigten Enterotoxinen mit
Sandwich-ELISA-Variante 2

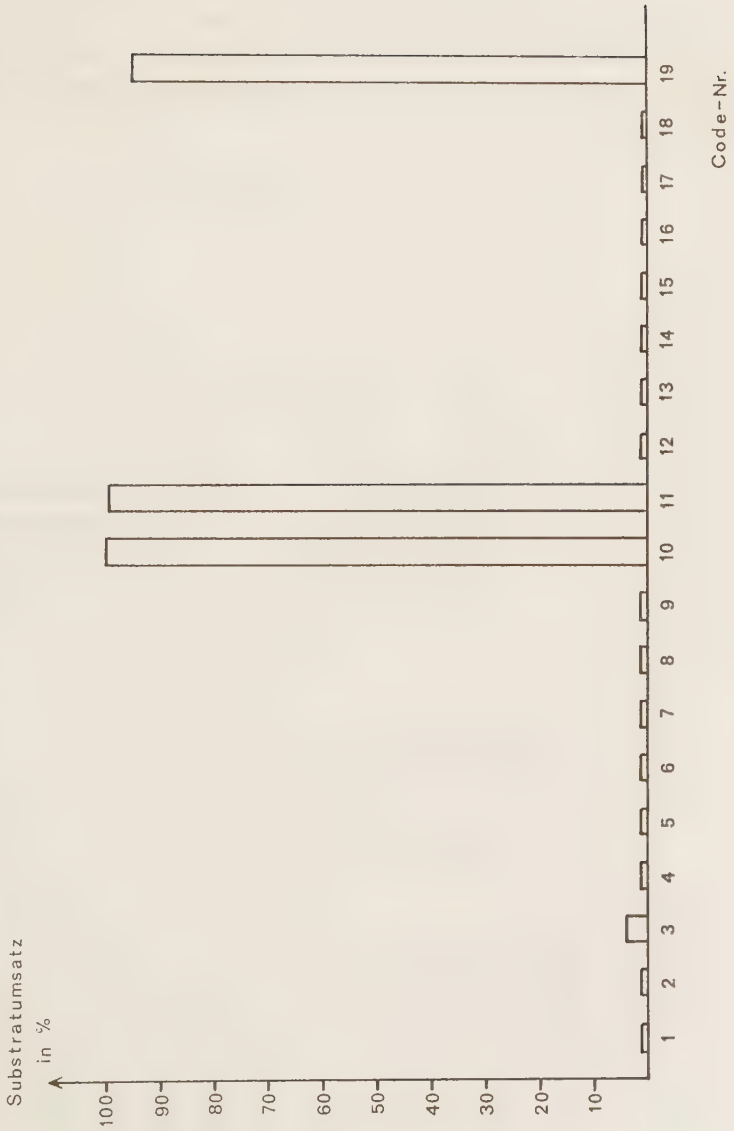
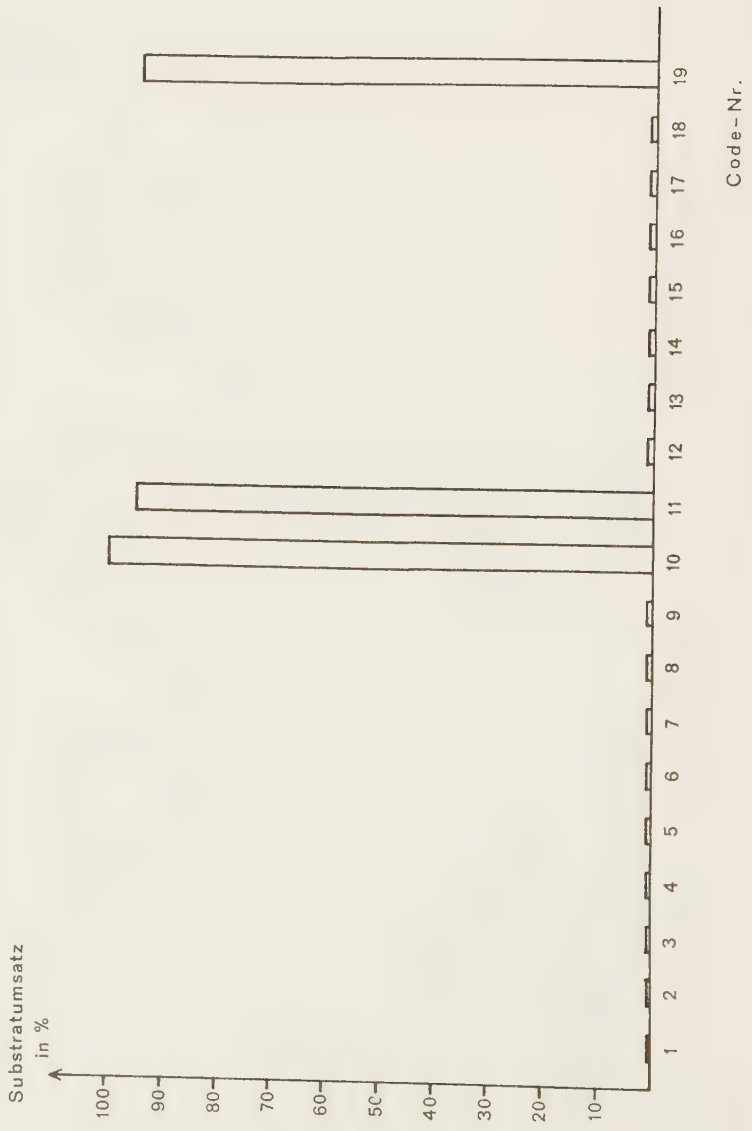


Abb. 24: Untersuchung von Kulturüberständen und gereinigten Enterotoxinen mit
Sandwich-ELISA-Variante 3



Nr. 14). Das der Theorie widersprechende Ergebnis für Stamm Nr. 3 wurde auch bei Wiederholungsuntersuchungen beobachtet. Die ELISA-Variante 3 (Abbildung 24) zeigte positive Reaktionen nur bei Nr. 10, Nr. 11 und Nr. 19. Sie erbrachte also ausschließlich mit SEE ein positives Resultat und zeigte keinerlei Kreuzreaktionen oder unspezifische Reaktionen.

3.6.5 Standardisierung der am besten geeigneten Sandwich-ELISA-Variante

3.6.5.1 Methodik

Aufgrund der in den Versuchen unter 3.6.2 bis 3.6.4 erzielten Ergebnisse wurde der Sandwich-ELISA zum spezifischen Nachweis von SEE unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Beschichtung der Mikrotiterplatte pro Kavität mit 0,1 ml in PBS, pH 7,2 gelöstem anti-SEE-Schaf IgG (Fr. IIa) in einer Konzentration von 20 µg/ml, anschließend dreistündige Inkubation bei 37 °C und Lagerung über Nacht bei 4 °C,
- Waschen der Platte (2 x),
- Absättigung freier Bindungsstellen (30 min mit 15 nmol/l BSA in PBS),
- Waschen der Platte (2 x),
- Beschickung der Kavitäten mit SEE (in PBS, 0,1 ml) bzw. Probe und 30 min Inkubation bei Raumtemperatur,
- Waschen der Platte (2 x),
- Zugabe von 0,1 ml SEE/A-Antikörperkonjugat (1:5000 verdünnt) und 30 min Inkubation bei Raumtemperatur,
- Waschen der Platte (3 x),
- Zusatz von 0,1 ml Substratlösung nach GALLATI und PRACHT (1985) und 10 min Inkubation bei Raumtemperatur,
- Stoppen der Reaktion mit 1 mol/l H₂SO₄ (0,1 ml/Kavität) und Messung der Extinktion bei 450 nm im Autoreader.

3.6.5.2 Ergebnisse

Der Verlauf der aus den arithmetischen Mittelwerten der Proben (Vierfachansatz) ermittelten SEE-Standardkurve ist der Abbildung 25 zu entnehmen. Als Nachweisgrenze für SEE wurde diejenige Konzentration angenommen, deren Extinktionswert über $\bar{x} + 2s$ der Leerwertextinktionen liegt. Sie beträgt 0,1 ng/ml SEE.

3.7 Affinitätschromatographische Reinigung von SEE

3.7.1 Produktion von SEE

3.7.1.1 Material

Zur Produktion wurden verwendet:

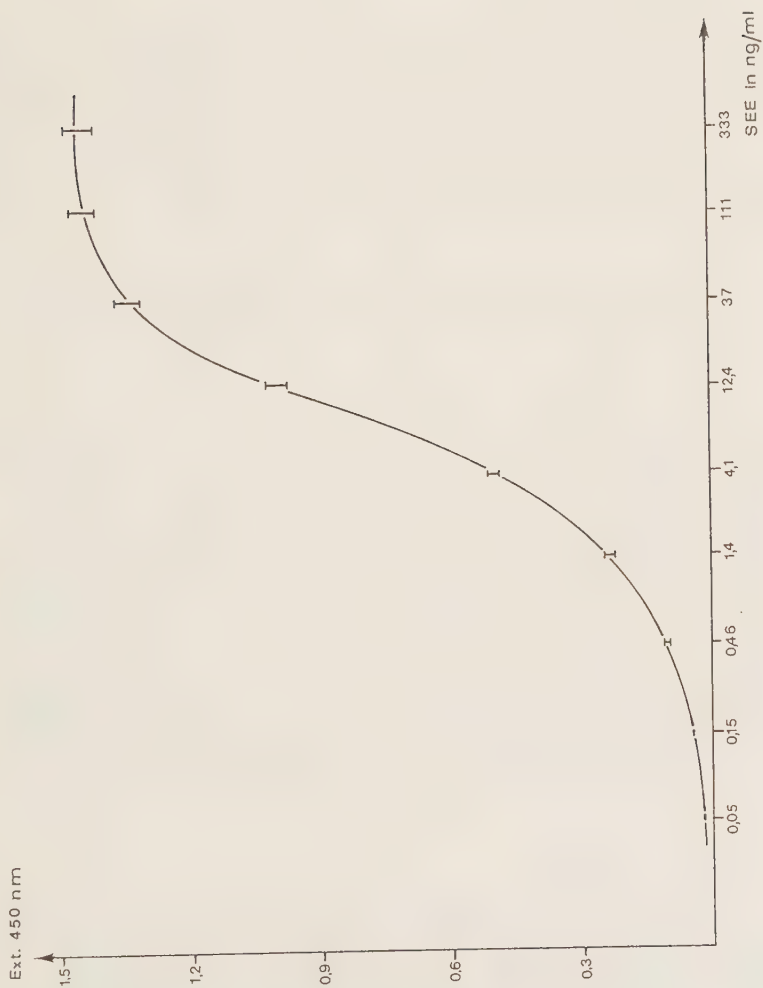
- S. aureus-Stamm FRI 326,
- BHI (Oxoid),
- Agar Bacteriological (Oxoid),
- Visking Dialysierschlauch (Serva),
- Brutschrank (Memmert),
- Schüttelbrutschrank (Braun, RS-1-T),
- Kühlzentrifuge (Heraeus Christ, Cryofuge 20-3),
- Roux-Flaschen, Erlmeyerkolben (2 l) und andere einfache Laborutensilien,
- verschiedene Laborchemikalien in p.A. Qualität (Merck),
- alle Materialien zur Durchführung des Sandwich-ELISA zum SEE-Nachweis (siehe 3.6.5).

3.7.1.2 Methodik

Die SEE-Produktion erfolgte in Anlehnung an das "sac-culture"-Verfahren nach DONNELLY et al. (1967).

Die Bebrütung erfolgte im Schüttelbrutschrank bei 80 U/min und 37 °C über 48 h. Abschließend wurde die Kultur bei 18.000 g und 4 °C 20 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und analysiert. Nach der Methode von

Abb. 25: Standardkurve zum Nachweis von SEE



LOWRY et al. (1951) wurde der Gesamtproteingehalt, mit Hilfe des ELISA der SEE-Gehalt ermittelt und schließlich der pH-Wert gemessen. Der Kulturüberstand wurde, mit 0,02 % NaN_3 versehen, bis zum weiteren Gebrauch bei 4 °C gelagert.

3.7.1.3 Ergebnisse

Bei einer SEE-Produktion mit 36 Erlmeyerkolben wurden ca. 1,8 l Kulturüberstand gewonnen. Dieser wies einen Gesamtproteingehalt von ca. 24,5 mg/ml auf. An SEE wurden ca. 0,01 mg/ml gefunden, so daß der Gesamtertrag dieser Produktion bei etwa 18 mg SEE lag. Der pH-Wert des Kulturüberstandes betrug 8,0.

3.7.2 Isolierung von SEE aus Kulturüberstand durch Adsorption an SEE/A-Antikörper-Sepharose

3.7.2.1 Material

Bei der Absorption von anti-SEE-Schafserum an SEA-Sepharose (siehe 3.3) konnten aus 230 ml Serum (Schaf 4) ca. 90 mg SEE/A-Antikörper gewonnen werden. 53 mg davon standen für diese Versuche zur Bindung an aktivierte CH-Sepharose 4B zur Verfügung. Weitere Details zu den für die affinitätschromatographische Reinigung verwendeten Materialien finden sich unter 3.3.1. Benötigt wurde darüberhinaus das Material zur Durchführung des Sandwich-ELISA (siehe 3.6). Zur Bestimmung von Schaf-Gamma-Globulin wurden anti-Schaf IgG (DAKO) und anti-Schaf-HRP (DAKO), sowie Schaf-Gamma-Globulin (Sigma) als Bezugsstandard benutzt.

3.7.2.2 Methodik

Zur Herstellung der Matrix wurden 5 g gefriergetrocknete Sepharose eingesetzt. Die Kopplungsprozedur für die 53 mg SEE/A-Antikörper, die nach extensiver Dialyse gegen den Kopplungspuffer (0,1 mol/l NaHCO_3 + 0,5 mol/l NaCl, pH 8,0)

in 27 ml gelöst vorlagen, war identisch mit der unter 3.3.2 für SEA beschriebenen Methodik. Die Säule wurde ebenfalls analog zu 3.3.2 gepackt.

Der Kulturüberstand wurde vor dem Auftragen auf die SEE/A-Antikörper-Sepharose 1:2 mit 0,1 mol/l Tris-HCl mit 0,5 mol/l NaCl, pH 8,0 verdünnt, um Proteinaggregationen zu vermeiden. Um die Absorptionskapazität der Säule zu erfassen, wurden Fraktionen des durch die Säule gelaufenen Kulturüberstandes auf ihren Gehalt an SEE im Sandwich-ELISA untersucht. Nach Überschreiten der Kapazitätsgrenze wurde der Kulturüberstand abgehängt und die Säule mit Trispuffer gespült, bis die Extinktion eine Basislinie erreicht hatte. Dann wurde durch Wechsel des Puffers auf 0,1 mol/l Glycin-HCl mit 0,5 mol/l NaCl, pH 2,8 die Elution des an die SEE/A-Antikörper gebundenen Materials eingeleitet. In Abbildung 26 ist der Ablauf dieser affinitätschromatographischen Reinigung graphisch dargestellt.

Das eluierte SEE wurde nach dem Poolen zuerst gegen PBS dialysiert, um den pH-Wert anzuheben, und anschließend gegen entsprechend verdünnte PBS dialysiert, um eine Ankonzentrierung zu ermöglichen. Die Kalkulation der Menge des gewonnenen Toxins erfolgte durch Messung der Extinktion bei 277 nm unter Verwendung des von BORJA et al. (1972) angegebenen Koeffizienten $E (1 \% ; 1 \text{ cm}) = 12,5$. Auf die SEE-Bestimmung mittels ELISA mußte verzichtet werden, da zu diesem Zeitpunkt kein Bezugsstandard zur Verfügung stand. Vor der Messung wurde sterilfiltriert. Mit Hilfe eines Rotationsverdampfers wurde die Konzentration auf 2 mg/ml eingestellt und das SEE bei -20°C gelagert.

3.7.2.3 Ergebnisse

Die zur Kopplung eingesetzten 53 mg SEE/A-Antikörper konnten zu mehr als 99 % an die Matrix gebunden werden; im Kopplungsüberstand konnten nur noch ca. 0,04 mg SEE/A-Antikörper mittels ELISA nachgewiesen werden.

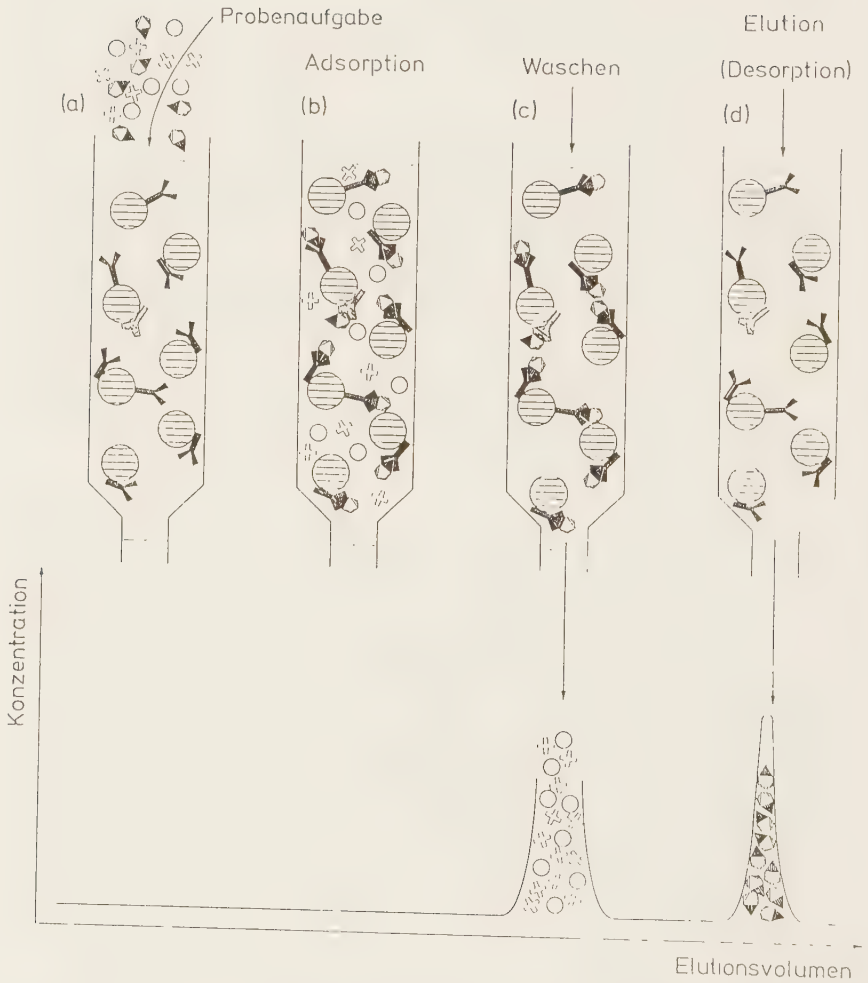


Abb.26: Affinitätschromatographische Isolierung von SEE. (a) Die Säule enthält an die Matrix gebundene SEE/A Antikörper. SEE-haltiger Kulturüberstand wird aufgegeben. (b) SEE bindet an die immobilisierten SEE/A-Antikörper. (c) Nicht gebundene Kulturüberstandsbestandteile werden durch Waschen entfernt. (d) SEE wird durch Änderung des pH-Wertes als scharfer Peak eluiert. (Legende s. S. 54)

Die Absorptionskapazität der Säule war nach der Passage von einem Liter des 1:2 verdünnten Kulturüberstandes erschöpft: Der SEE-Gehalt des durch die Säule gelaufenen Kulturüberstandes stieg von 0,5 ng/l auf den ursprünglichen Gehalt von 0,005 mg/ml. Der Absorptionsgrad der Säule lag somit bei 99,99 %. Beim anschließenden Waschen der Säule mit Trispuffer erreichte die Basislinie nicht mehr ganz das Niveau der Extinktion wie vor dem Auftragen des Kulturüberstandes auf die Säule. Die Säulenmatrix hatte eine leicht bräunliche Färbung angenommen. Für die Elution des Toxins wurden ca. 70 ml Glycinpuffer benötigt. Die Menge des gewonnenen SEE betrug ca. 5 mg. In Abbildung 27 ist das typische Elutionsprofil eines Affinitätschromatographielaufes zur Reinigung von SEE wiedergegeben.

3.7.3 Isolierung von SEE aus anderen Medien

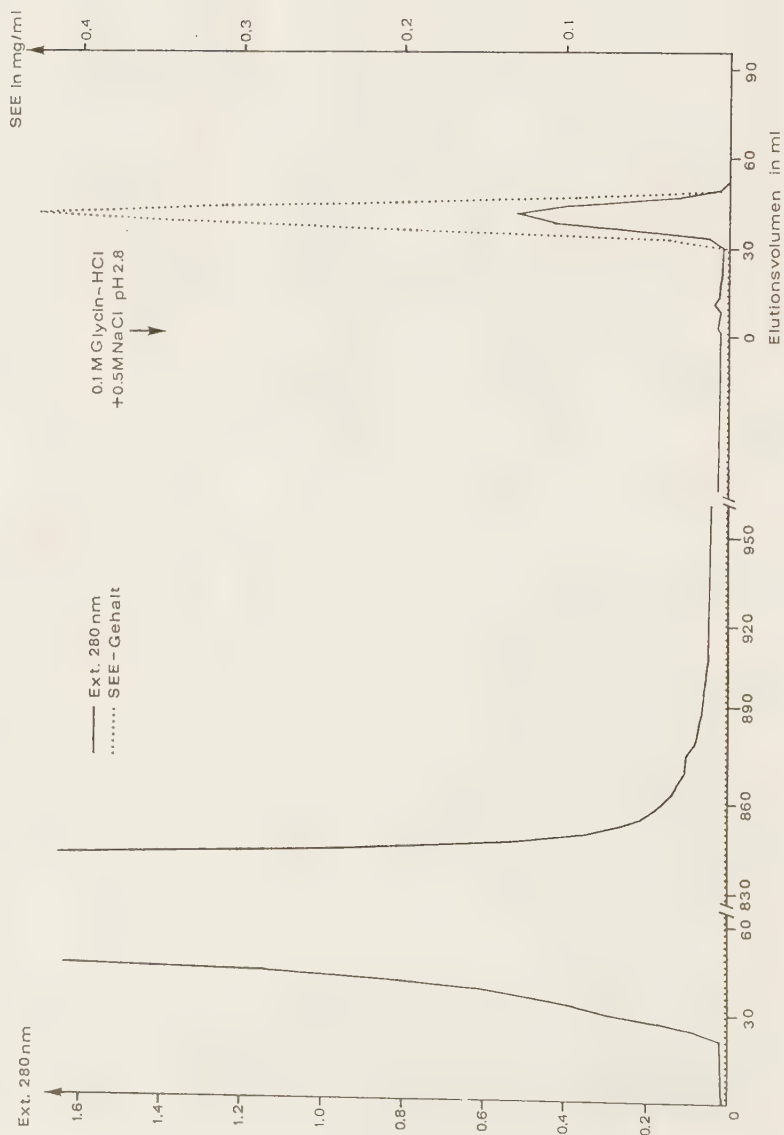
3.7.3.1 Material und Methodik

Bei der Reinigung von SEE nach dem früher praktizierten Verfahren (siehe 3.1.1) fielen stets gewisse Mengen an SEE-haltigen Medien an, deren Weiterverwendung unökonomisch war. Es handelte sich dabei um Eluat von SP-Sephadex, sowohl entsalzt (s.a. Affinitätschromatographielauf 3, Abb. 28 und 29) als auch nicht entsalzt (s.a. Lauf 5, Abb. 28 und 29). Der pH-Wert dieser Medien wurde auf 8,0 eingestellt und die Leitfähigkeit durch Zugabe von NaCl auf 110 mS angehoben. Diese Medien wurden über die SEE/A-Antikörper-Sepharose Säule geschickt, um das enthaltene SEE zu gewinnen. Der Lauf über die Säule erfolgte wie unter 3.7.2 beschrieben.

3.7.3.2 Ergebnisse

Das in den Medien enthaltene SEE konnte gleichfalls mit einer Absorptionsrate von 99,99 % gewonnen werden. Die selbst fast farblosen Medien hinterließen keine Verfärbung der Gelmatrix.

Abb. 27: Isolierung von SEE durch Affinitätschromatographie an SEE/A-Antikörper-Sephrose (siehe Text)



3.7.4 SDS-Gelelektrophorese von affinitätsgereinigtem SEE

3.7.4.1 Material

Neben affinitätsgereinigtem SEE wurde auch konventionell gereinigtes SEE (s. 3.1.1) sowie gereinigtes SEA (Bergdoll) eingesetzt. Folgende Geräte und Reagenzien wurden verwendet:

- Multiphor II Elektrophoresekammer (LKB),
- Stromversorgungsgerät (LKB),
- Multitemp II Laborkryostat (LKB),
- Gradientenmischer (LKB),
- Filterpapier (LKB),
- Glasplatten 25,7 cm x 12,2 cm x 0,3 cm,
- Küvettenklammern (LKB),
- Gelbond PAG-Film (LKB),
- Fotowalze, 15 cm breit,
- niedermolekularer Elektrophorese-Eichkit (Pharmacia),
- verschiedene Chemikalien gemäß Vorschrift LKB - SD RE 003 in p.A. Qualität.

3.7.4.2 Methodik

Die SDS-Gelelektrophorese wurde in horizontalen, ultradünnen Polyacrylamidgelen mit einem Porengradienten ($T = 7,5-22,5\%$; $C = 3\%$) durchgeführt (GÖRG et al., 1981; 1982).

Das Herstellen der Gele, die Durchführung der Elektrophorese sowie das Färben der Gele erfolgten gemäß der LKB-Vorschrift SD RE 003. Die Probenvorbereitung geschah wie folgt: Die Proben (1-2 mg/ml Proteingehalt) wurden im Verhältnis 8:1 mit einer 0,25 %igen wäßrigen Bromphenolblau-Lösung, die 10 % Natriumdodecylsulfat (SDS) enthielt, versetzt und 3 min auf 100 °C erhitzt. Ein niedermolekularer Elektrophorese-Eichkit wurde zur Molekulargewichtsbestimmung mitgeführt.

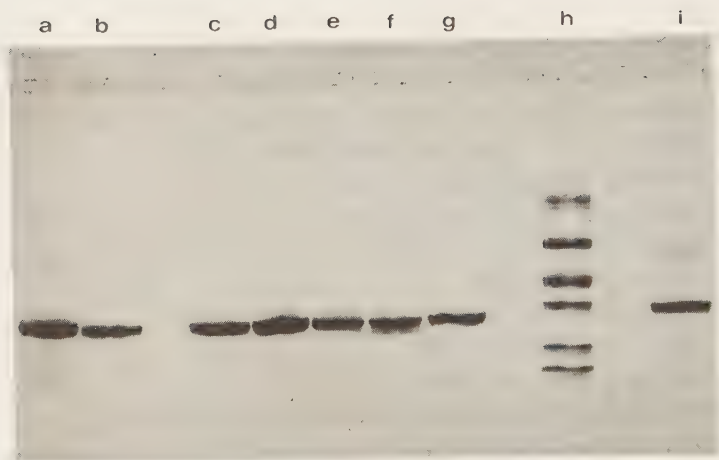


Abb. 28a: SDS-Gelelektrophorese von affinitätsgereinigten SEE-Präparationen.

SDS-Gelelektrophorese in ultradünnem Polyacrylamidgel mit linearem Porengradienten

(T = 7,5-22,5 %; C = 3 %).

- a) SEE aus Lauf 5 (2 mg/ml)
- b) SEE aus Lauf 3 (2 mg/ml)
- c) SEE aus Lauf 1 (2 mg/ml)
- d) SEE aus Lauf 2 (2 mg/ml)
- e) SEE aus Lauf 4 (2 mg/ml)
- f) SEE aus Lauf 6a (2 mg/ml)
- g) SEE aus Lauf 6b (2 mg/ml)
- h) Eichproteine mit Molgewicht in Dalton, von oben nach unten: Phosphorylase b, 94.000; Rinderse-
rumalbumin, 67.000; Eialbumin, 43.000; Carboan-
hydrase, 30.000; Trypsininhibitor, 20.100;
 α -Lactalbumin, 14.400.
- i) SEA, Bergdoll (2 mg/ml)

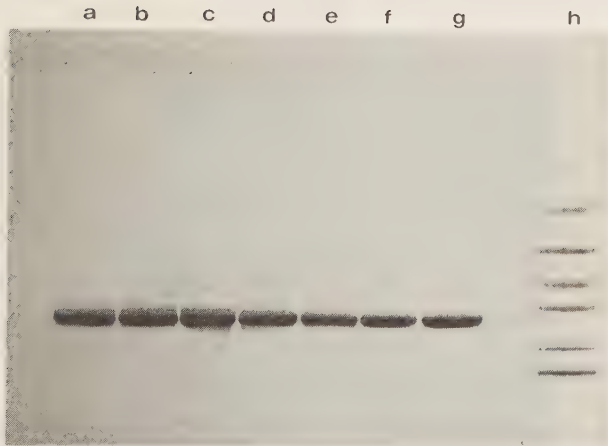


Abb. 28b: SDS-Gelelektrophorese von affinitätsgereinigten SEE-Präparationen.

SDS-Gelelektrophorese in ultradünnem Polyacrylamidgel mit linearem Porengradienten
($T = 7,5-22,5 \%$; $C = 3 \%$).

- a) SEE aus Lauf 6c (2 mg/ml)
- b) SEE aus Lauf 6d (2 mg/ml)
- c) SEE aus Lauf 7a (2 mg/ml)
- d) SEE aus Lauf 7b (2 mg/ml)
- e) SEE aus Lauf 7c (2 mg/ml)
- f) SEE aus Lauf 8a (2 mg/ml)
- g) SEE aus Lauf 8b (2 mg/ml)
- h) Eichproteine mit Molgewicht in Dalton, von oben nach unten: Phosphorylase b, 94.000; Rinderse-
rumalbumin, 67.000; Eialbumin, 43.000; Carboan-
hydrase, 30.000; Trypsininhibitor, 20.100;
 α -Lactalbumin, 14.400.

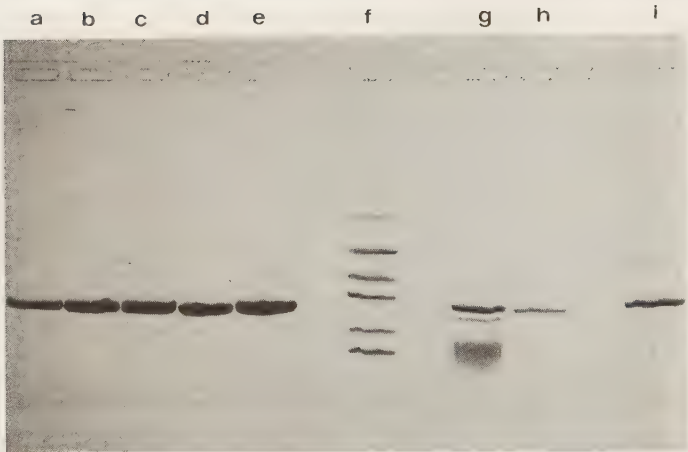


Abb. 28c: SDS-Gelelektrophorese von affinitätsgereinigten SEE-Präparationen.

SDS-Gelelektrophorese in ultradünnem Polyacrylamidgel mit linearem Porengradienten

(T = 7,5-22,5 %; C = 3 %).

a) SEE aus Lauf 1 (2 mg/ml)

b) SEE aus Lauf 2 (2 mg/ml)

c) SEE aus Lauf 4 (2 mg/ml)

d) SEE aus Lauf 6a (2 mg/ml)

e) SEE aus Lauf 6b (2 mg/ml)

f) Eichproteine mit Molgewicht in Dalton, von oben nach unten: Phosphorylase b, 94.000; Rinderserumalbumin, 67.000; Eialbumin, 43.000; Carboanhydrase, 30.000; Trypsininhibitor, 20.100; α -Lactalbumin, 14.400.

g) SEE 'A', chromatofokussiert (1,6 mg/ml)

h) SEE 'B', chromatofokussiert (1,1 mg/ml)

i) SEA, Bergdoll (2 mg/ml)

3.7.4.3 Ergebnisse

Die Abbildungen 28a,b,c geben die Gelelektrophoresen verschiedener SEE-Präparationen und einer SEA-Präparation wieder. Bei den affinitätsgereinigten SEE-Präparationen ist die Chromatographie-Lauf-Nummer angegeben. Aus den Abbildungen geht hervor, daß in den Präparationen Material mit einem Molekulargewicht von ca. 29.000 D vorliegt. Die Reinheit der Präparationen im Bild der SDS-PAGE war nicht einheitlich, die Intensität und Breite der Banden variierte etwas. Beim Vorliegen kräftiger SEE-Banden ließen sich teilweise zusätzlich schwache Banden bei ca. 45.000 D und ca. 60.000 D erkennen, wie bei Lauf 7a und 7b. In Abbildung 28c sind affinitätschromatographisch gereinigte SEE-Präparationen den anfänglich verfügbaren über Ionenaustauschchromatographie, Chromatofokussierung und Gelfiltration gereinigten Präparationen (siehe 3.1.1) gegenübergestellt. Die Präparation 'A' zeigt neben einer Bande bei 29.000 D eine weitere bei ca. 27.000 D und eine breite, unscharf auslaufende Bande um 15.000 D. Die Präparation 'B' zeigt nur eine Bande bei 29.000 D. Die Intensität dieser Bande ist schwächer als es die Konzentrationsangabe für die Präparation erwarten läßt. Das für die anti-SEE-Serum Absorption verwendete SEA von Prof. Bergdoll (3.3.1) läßt neben einer Bande bei ca. 30.000 D eine schwache Bande bei ca. 60.000 D erkennen.

3.7.5 Isoelektrische Fokussierung (IEF) von affinitätsgereinigtem SEE

3.7.5.1 Material

Abweichend von bzw. zusätzlich zu den unter 3.7.4.1 genannten Materialien wurden verwendet:

- Ultrophor IEF-Kammer (LKB),
- pH-Oberflächenelektrode (Ingold),
- Probenaufgabestücke (LKB),
- Elektrodenstreifen (LKB),

- Ampholine, pH 3,5-9,5 (LKB),
- verschiedene Chemikalien gemäß Vorschrift LKB SD RE 001.

3.7.5.2 Methodik

Die IEF wurde in Form der Ultradünnschicht-isoelektrischen Fokussierung in Polyacrylamidgelen (GÖRG et al., 1979) mit Ampholinen, pH 3,5-9,5 durchgeführt. Die Herstellung der 0,36 mm starken Gele und der Elektrodenlösungen erfolgte nach der LKB-Vorschrift SD RE 001. Vor der Probenaufgabe wurde 15 Minuten bei 4 °C, 500 V, 250 mA und 20 W vorfokussiert. Die Proben wurden über Glasfaserprobenaufgabestücke auf das Gel aufgetragen. Die Probenkonzentration betrug 1-2 mg/ml Protein (bestimmt über Extinktionsmessung bei 277 nm). Die Fokussierung erfolgte bei 4 °C, 2000 V, 250 mA und 20 W über 90 Minuten. Unmittelbar nach Ende der Fokussierung wurde mit einer Oberflächenelektrode auf einer Linie zwischen Anode und Kathode der pH-Gradient gemessen. Nach dem Färben des Gels entsprechend der Vorschrift wurden die pI-Werte der Proben anhand des gemessenen pH-Gradienten bestimmt.

3.5.7.3 Ergebnisse

In Abbildung 29 sind die Bilder der SEE- und SEA-Präparationen in der IEF wiedergegeben. Es zeigte sich, daß affinitätschromatographisch gereinigtes SEE eine sehr ausgeprägte Mikroheterogenität aufweist. Die isoelektrischen Punkte lagen zwischen pH 8,0 und pH 5,5. Die stärkste Bande fokussierte bei pH 7,6, weitere kräftige Banden lagen bei pH 7,8, 7,2, 6,8 und 6,6. Insgesamt waren 17 differenzierbare Banden sichtbar. Die Ausprägung einzelner Banden war, von der Hauptbande abgesehen, bei SEE aus verschiedenen Produktionen gewissen Schwankungen unterworfen, doch waren immer alle Banden vorhanden. Ein anderes Bild zeigte die SEE-Präparation 'A': Sie wies eine starke Doppelbande bei pH 7,8-7,9 auf sowie zwei schwache bei pH 7,6 und pH 8,0. Das Bild für

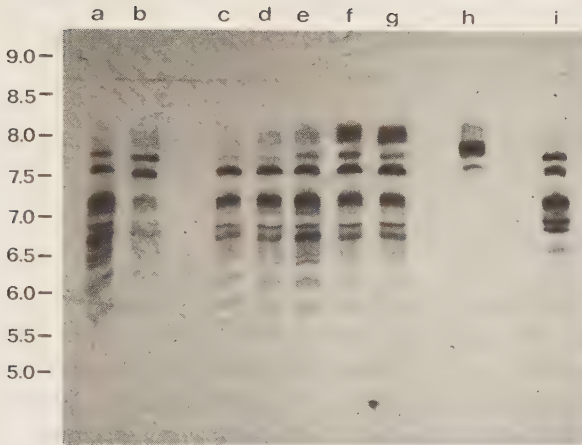


Abb. 29: Isoelektrische Fokussierung von affinitätsgereinigten SEE-Präparationen.

Isoelektrische Fokussierung in ultradünnem Polyacrylamidgel mit Ampholinen (pH 3,5-9,5 bei 4 °C). Der pH Wert wurde bei 4 °C mit einer Oberflächen-Elektrode bestimmt.

- a) SEE aus Lauf 3 (2 mg/ml)
- b) SEE aus Lauf 5 (2 mg/ml)
- c) SEE aus Lauf 1 (2 mg/ml)
- d) SEE aus Lauf 2 (2 mg/ml)
- e) SEE aus Lauf 4 (2 mg/ml)
- f) SEE aus Lauf 6a (2 mg/ml)
- g) SEE aus Lauf 6b (2 mg/ml)
- h) SEE 'A', chromatofokussiert (1,6 mg/ml)
- i) SEA, Bergdoll (2 mg/ml)

die SEE-Präparation 'B' entsprach bei etwas geringerer Intensität der Banden jenem der SEE-Präparation 'A'. Das SEA von Prof. Bergdoll fokussierte mit seiner Hauptbande bei pH 7,0, außerdem recht stark bei pH 7,6 und pH 7,8 und schwächer bei pH 6,8.

3.7.6 Gelfiltration von affinitätsgereinigtem SEE an Sephadex G-50

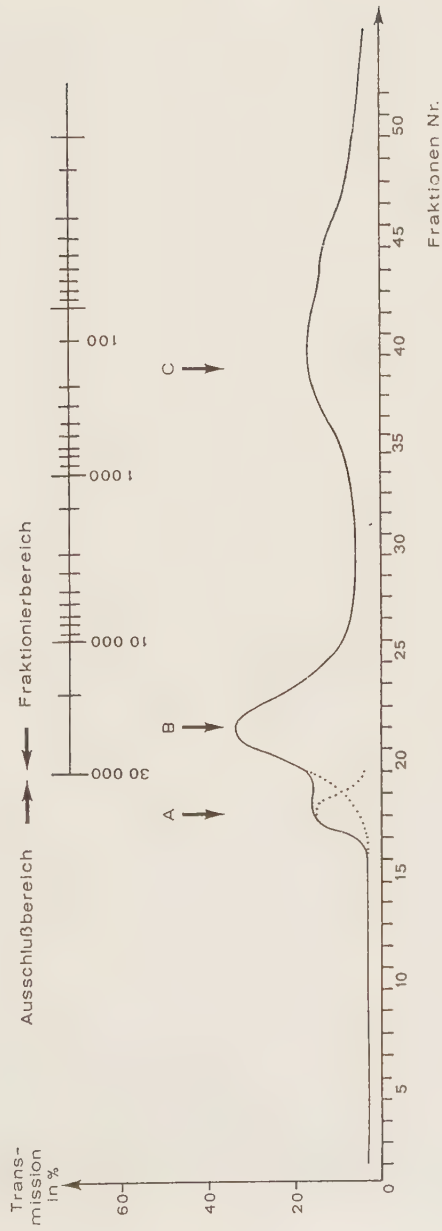
3.7.6.1 Material und Methodik

Mit Sephadex G-50 fine (Pharmacia, 17-0042-02) wurde eine Säule (1,6 cm x 55 cm) gepackt und mit PBS, pH 7,2 äquilibriert. Die affinitätsgereinigten SEE-Chargen 7a, 7b und 7c, die in der SDS-PAGE Verunreinigungen (Abb. 28) gezeigt hatten, wurden gepoolt und nach Dialyse gegen entsprechend verdünnte PBS auf 2 ml eingeengt. Die Proteinkonzentration betrug ca. 3 mg/ml. Die Probe wurde mit PBS bei einer Flußrate von 10 ml/h eluiert und in Fraktionen zu 2,8 ml gesammelt.

3.7.6.2 Ergebnisse

In Abbildung 30 ist das Diagramm der Elution dargestellt. Es sind drei Peaks erkennbar, die mit A, B und C bezeichnet wurden. Der Peak A enthielt alles Material, das größer ist als 30.000 D und im Ausschlußvolumen der Säule eluiert wird. Peak B bestand aus SEE. Da ab Fraktion 20 keine Überlagerung der Peaks A und B mehr gegeben war (s. Abb. 29), konnte SEE in den Fraktionen 20 bis 25 gepoolt werden. Peak C enthielt kleinmolekulare Bestandteile. Eine spätere Überprüfung der Fraktionen 20 bis 25 ergab, daß es sich hierbei tatsächlich um SEE gehandelt hat.

Abb. 30: Gelfiltration von affinitätsgereinigtem SEE an Sephadex G-50 fine (siehe Text)



4 DISKUSSION

Staphylococcus aureus zählt weltweit neben *Salmonellen* zu den häufigsten bakteriellen Lebensmittelvergiftungen (BECKERS, 1986; TODD, 1987). Die als Staphylokokken-Intoxikation bezeichnete Erkrankung wird durch hitzestabile Enterotoxine (SE) hervorgerufen, die von etwa 50 % (NOTERMANS et al., 1984a) der koagulasepositiven Staphylokokken gebildet werden. Nach neuesten Erkenntnissen reichen 100-200 ng SE zur Auslösung einer derartigen Lebensmittelvergiftung (KOKAN und BERGDOLL, 1987); im allgemeinen wurde bisher davon ausgegangen, daß die mittlere krankmachende Dosis für den Menschen bei etwa 0,14 µg/kg Körpergewicht liegt (DANGERFIELD, 1973).

Die SE werden aufgrund ihrer Reaktion mit spezifischen Antikörpern in verschiedene Typen eingeteilt. Nach KOKAN und BERGDOLL (1987) ist davon auszugehen, daß neben den bekannten SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED und SEE noch weitere bisher nicht identifizierte Typen existieren. Diese Schlußfolgerung basiert auf der Beobachtung, daß von 110 Stämmen, die im Affenfütterungstest (SURGALLA et al., 1953) Erbrechen bewirkten und damit als enterotoxinogen anzusehen sind, 84 (76,4 %) im ELISA (FREED et al., 1982) trotz Anzüchtung mittels Zellophan-Membran-Technik negativ reagierten. Der Nachweis der SE ist aus epidemiologischen Gründen wichtig und dient außerdem dazu, die Erfahrungen hinsichtlich der Prophylaxe der Lebensmittelvergiftungen zu erweitern. Der Affenfütterungstest kann der nicht unerheblichen Anschaffungs- und Haltungskosten sowie tierschützerischen Aspekte wegen für Routineuntersuchungen nicht zur Anwendung kommen (ZAADHOF, 1978). Seitdem spezifische Antikörper zur Verfügung stehen, sind serologische Nachweisverfahren das Mittel der Wahl. Von einem derartigen Test wird eine Nachweisempfindlichkeit von 0,1 µg SE pro 100 g bzw. 250 ml Lebensmittel verlangt (BERGDOLL, 1979). Die derzeit wohl noch verbreitetste Nachweismethode ist der Gelpräzipitationstest nach OUCHTERLONY (1948). Wegen der relativ geringen Sensitivität,

der zuvor erforderlichen zeit- und arbeitsaufwendigen Extraktions-, Teilreinigung- und Konzentrierungsschritte und der langen Inkubationszeit wurden dann Verfahren entwickelt, die bei größerer Empfindlichkeit auch eine Verkürzung des Zeitaufwandes ermöglichten. Unter den dabei erprobten Methoden - z. B. passive Hämagglutination, Latex-Agglutination, Radio-Immunist (RIA), Enzym-Immunist (EIA)-, hat der EIA die größte Bedeutung gewonnen. Dieses Nachweisverfahren auf der Basis der von ENGVALL und PERLMANN (1971) sowie van WEEMEN und SCHUURS (1971) entwickelten enzymimmunologischen Tests weist bei der praktischen Durchführung viele Vorteile auf: Es ist ohne besondere Ausbildung des Personals, ohne besondere Sicherheitsvorkehrungen (im Gegensatz zum RIA), mit vergleichsweise simplen Gerätschaften, preiswert und rationell in Routinelabors durchzuführen. SIMON und TERPLAN (1977) beschrieben als erste einen Nachweis von SE - und zwar Typ B - in Lebensmitteln mittels einer kompetitiven Technik in Polystyrolröhrchen. In fortführenden Experimenten an diesem Institut wurde der Test optimiert und rationalisiert (z. B. Einsatz von Mikrotiterplatten, automatische Auswertung mit einem Spezialgerät - Mikro-ELISA Autoreader). Außerdem wurde aufgrund von Vergleichsuntersuchungen der empfindlicheren und kostengünstigeren Sandwich-Technik der Vorzug gegeben (TERPLAN, 1982; LINZ, 1983). Durch ihren Einsatz entfällt nicht nur die schwierige Herstellung großer Mengen an gereinigten SE - was insbesondere für SED und SEE zutrifft -, auch die Einstellung der Reaktionspartner ist weniger kritisch (FEY et al., 1982). Schließlich wurde der Test um den Nachweis von SEC₁ (SCHREINER, 1985) sowie SEA und SED (unveröffentlichte Ergebnisse) erweitert.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein empfindliches enzymimmunologisches Verfahren nach dem Sandwich-Prinzip für den spezifischen Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin E (SEE) entwickelt und damit das Testsystem komplettiert werden.

Zur Gewinnung des Antiserums wurden zwei Schafe mit SEE immunisiert. Abweichend vom Schema nach NOTERMANS (1982)

wurden nach der aus fünf intramuskulären Injektionen (10, 20, 40, 100 und 200 µg SEE) bestehenden Grundimmunisierung mehrere Boosterinjektionen (0,2 bzw. 0,28 mg SEE) vorgenommen. Dies geschah aufgrund der Erfahrungen bei der Immunisierung von Schafen mit SEB (LOHNEIS, 1984), SED (HARTUNG, 1986) und SEC₁ (eigene unveröffentlichte Versuche). Bei diesen Immunisierungen hatten die Restimulierungen nämlich zu einem deutlichen Anstieg der Antikörpertiter (Endtiter präzipitierender Antikörper von mehr als 1:1000 statt 1:32 bis 1:256) geführt. Das SEE war in Anlehnung an IGARASHI et al. (1984) unter Einschluß der Chromatofokussierung (ENDE et al., 1983) gereinigt worden. Das für die Grundimmunisierung und die ersten drei Boosterinjektionen verwendete SEE wies im Gegensatz zu dem später für die vierte bis sechste Boosterinjektion verwendeten Antigen in der SDS-PAGE neben der Bande im Molekulargewichtsbereich von SEE (29.000 D) noch zwei weitere Banden (ca 27.000 D bzw. 15.000 D) auf. Die Kontrolle des Antikörpertiterverlaufes bei den Schafen erfolgte mit Hilfe des OUCHTERLONY-Geldiffusionstests in der Modifikation nach SOMMERFELD und TERPLAN (1975). Dabei zeigte sich, daß die anti-SEE-Titer sich nach der Grundimmunisierung auf 1:128 beliefen und nach den Boosterinjektionen maximal 1:320 bzw. 1:400 betrugen. Ab der dritten Boosterung konnten die Titer allerdings nur mehr geringfügig gesteigert werden. Die Gewinnung des Antiserums erfolgte nach der sechsten Boosterinjektion, da hier kein Titeranstieg mehr beobachtet wurde, obwohl der erreichte Endtiter im Vergleich mit jenen der o. g. Immunisierungen gegen SEB, SEC₁ und SED nicht ganz befriedigen konnte. Eine Ursache für die niedrigeren Endtiter könnte die Tatsache sein, daß der SEE-Gehalt der als Antigen eingesetzten Präparationen geringer war als angenommen. Dieser war nämlich, da eine serologische Bestimmung mangels ausreichender Mengen an Antiserum nicht durchgeführt werden konnte, durch photometrische Messung bei 277 nm unter Berücksichtigung des von BORJA et al. (1972) für SEE angegebenen Extinktionskoeffizienten ermittelt worden. Hierbei werden jedoch auch evtl.

vorhandene Nicht-SEE-Anteile miterfaßt, wie später zumindest für die anfänglich injizierte Präparation durch o. a. Resultate der SDS-PAGE bestätigt wurde. Möglicherweise war auch eine herabgesetzte individuelle Immunantwort der zur Immunisierung verwendeten Schafe für das schlechtere Ergebnis mitverantwortlich. Auf die starken Unterschiede in der Immunantwort einzelner Tiere hatten auch ROBBINS und BERGDOLL (1984) hingewiesen. Schließlich ist in Betracht zu ziehen, daß SEE ähnlich wie SEA weniger stark antigen wirksam ist als SEB, SEC und SED. Hierauf deuten die von YAMADA et al. (1977), JOZEFczyk et al. (1980), RICHTER und KARSCH (1980) sowie ROBBINS und BERGDOLL (1984) bei Kaninchen registrierten Antikörpertiter hin. Als Vorteile der Verwendung von Schafen als Antikörperspender sind herauszustellen, daß die Serumausbeute bei nur geringfügig höherem Antigeneinsatz deutlich größer ist und daß der Anteil der mit Staphylokokken-Protein A reagierenden Immunglobuline in den Seren von Schafen wesentlich geringer ist als in Kaninchenserum. Letzteres ist insofern für den Sandwich-ELISA zum Nachweis von SE von Bedeutung, als bei Verwendung von Schaf-IgG keine Interferenzen mit dem erwähnten Protein A zu befürchten sind (NOTERMANS, 1982; LOHNEIS, 1984; SCHREINER, 1985).

Bei der Antikörpertiterbestimmung gegen SEE wurden im OUCHTERLONY-Geldiffusionstest auch unspezifische Präzipitationen beobachtet. Deshalb wurde das gewonnene Antiserum in der Immunelektrophorese nach GRABAR und WILLIAMS (1953) gegen verschiedene Reaktionspartner (z. B. gereinigte Enterotoxine und Kulturüberstände enterotoxinogener und nichtenterotoxinogener *S. aureus*-Stämme) getestet. Hierbei werden die Komponenten eines Antigengemisches elektrophoretisch aufgetrennt, bevor sie gegen das Antiserum diffundieren. Dadurch wird deutlicher als im Geldiffusionstest nach OUCHTERLONY sichtbar, ob und gegebenenfalls wie viele Antikörperfraktionen unterschiedlicher Antigenspezifität in einem Antiserum vorhanden sind. Aufgrund der nicht vollständigen Reinheit der zur Grundimmunisierung verwendeten

SEE-Präparation enthielt das Antiserum auch Antikörper, die mit den Kulturüberständen eines SEC₁ produzierenden (FRI 137) bzw. eines nichtenterotoxinogenen (FRI 184) S.aureus-Stammes, alpha-Hämolysin sowie nicht näher bestimmten Exoproteinen von S. aureus FRI 137 reagierten. Über die Existenz solcher Antikörper in anti-SE-Seren berichteten bereits CASMAN und BENNETT (1964), NOTERMANS et al. (1978) und FEY (1982). Da solche Antikörper die Spezifität und somit die Brauchbarkeit eines Antiserums herabsetzen, absorbierten diese Autoren die Antiseren an Kulturüberständen nichtenterotoxinogener S. aureus-Stämme. Die erstgenannten Autoren adsorbierten Kulturüberstand an Aluminiumhydroxid, NOTERMANS et al. (1978) und FEY (1982) dagegen koppelten Kulturüberstände jeweils an CNBr-aktivierte Sepharose 4B. Die Feststellungen dieser Autoren, daß sich mit Hilfe derartiger Immunosorbentien unerwünschte Antikörper aus den Antiseren entfernen und deren Spezifität verbessern läßt, konnten allerdings in eigenen Experimenten nicht (Verfahren nach CASMAN und BENNETT) bzw. nicht vollständig bestätigt werden. Diese Versuche wurden daher eingestellt. Als andere Möglichkeit zur Lösung des Spezifitätsproblems bot sich die Nutzung der zuerst als störend empfundenen Tatsache an, daß das anti-SEE-Serum mit gereinigtem SEA kreuzreagierte. Diese auch von anderen Autoren (BERGDOLL et al., 1971; SHINAGAWA et al., 1977; YAMADA et al., 1977;) selbst bei monoklonalen Antikörpern gegen SEE (EDWIN et al., 1984; NOTERMANS et al., 1984a; THOMPSON et al., 1986) beobachtete Reaktion ist im übrigen (wie LEE et al. (1978) durch Immunadsorption von anti-SEA- bzw. anti-SEE-Seren am jeweils heterologen immobilisierten SE-Typ mit anschließender Desorption der gemeinsamen Antikörper nachweisen konnten) auf die Existenz einer gemeinsamen Antigendeterminante zurückzuführen. Theoretisch sollte aber dennoch ein spezifischer Nachweis von SEE im Sandwich-ELISA durch eine Kombination einer ausschließlich mit SEE und SEA reagierenden Antikörperfraktion mit einer von solchen gemeinsamen Antikörpern freien anti-SEE-IgG-Fraktion möglich sein.

Aufgrund dieser Überlegung wurde mit dem anti-SEE-Serum eine Affinitätschromatographie an SEA-Sepharose durchgeführt, um die gemeinsamen Antikörper gegen SEA und SEE vollständig aus dem anti-SEE-Serum zu entfernen und zu isolieren. Diese Affinitätschromatographie verlief erfolgreich: Die isolierten SEE/A-Antikörper präzipitierten nur noch mit SEE und SEA und ergaben in der Immunelektrophorese mit SEE im Unterschied zum anti-SEE-Serum nur noch eine Präzipitationslinie. Aus dem bei dieser Affinitätschromatographie gegen SEA absorbierten anti-SEE-Serum, das in der Immunelektrophorese nicht mehr mit SEA reagierte, wurden im Hinblick auf eine Anreicherung der monospezifischen SEE-Antikörper IgG-Frak-tionen durch Ammoniumsulfatfällung und anschließende Ionen-austauschchromatographie an DEAE-Trisacryl M gewonnen. Für die weiteren Arbeiten wurde die in der SDS-PAGE eine einzige Bande aufweisende Fraktion IIa (Abb. 11) verwendet, die - wie in der Immunelektrophorese festgestellt wurde - IgG₁ enthält, das nach KESSLER (1976) nicht mit Protein A rea-giert.

Sowohl mit den isolierten SEE/A-Antikörpern als auch mit dem anti-SEE-IgG der Fraktion IIa wurden dann Enzymkonjugate nach der Methode von WILSON und NAKANE (1978) hergestellt. Als Markerenzym wurde Meerrettichperoxidase (HRP) verwendet. Dieses Enzym ist relativ preisgünstig, leicht an Antikörper zu koppeln, kann verschiedene Substrate umsetzen und wurde bisher bei den meisten EIA zum SE-Nachweis verwendet. Die Auftrennung der beiden Kopplungsgemische über Sephacryl S-200 erbrachte zwei fast gleiche Elutionsprofile. Das erlaubt den Schluß, daß die SEE/A-Antikörperpräparation ähnlich homogen ist wie das anti-SEE-IgG der Fraktion IIa. Die für beide Konjugate - Pools der Fraktionen mit einer Reinheitszahl von 0,4 bis 0,5 (WILSON und NAKANE, 1978) - ermittelten Gebrauchsverdünnungen (1:1000 für anti-SEE-HRP und 1:5000 für anti-SEE/A-HRP) spiegelten allerdings die höhere Spezifität der affinitätsgereinigten Antikörper wieder.

Zur Herstellung des Immunosorbens unter Verwendung von Mikrotiterplatten wurden für das anti-SEE-Schaf IgG verschiedene Beschichtungskonzentrationen im Bereich von 48,8 ng/ml bis 100 µg/ml auf ihre Eignung zum sensitiven SEE-Nachweis überprüft. Die Beschichtung erfolgte aufgrund von Vorversuchen wie bei SCHREINER (1985) mit dem in PBS, pH 7,2, gelösten IgG, die Inkubation erstreckte sich über 3 Stunden bei 37 °C und anschließend über Nacht bei 4 °C. Es zeigte sich, daß bei diesen Bedingungen bei anti-SEE-IgG-Konzentrationen oberhalb von 20 µg/ml keine Zunahme der Antigen- bzw. Konjugatbindung mehr zu erreichen war. Eine Erklärung für diese auch von SIMON (1978), LINZ (1983), LOHNEIS (1984) und SCHREINER (1985) beschriebene Beobachtung ist, daß die Antigenbindungsrate jenseits einer bestimmten Konzentration zwar weiter zunimmt, die Anzahl der Antigenbindungsstellen aber aufgrund der Bildung mehrschichtiger Proteinlagen oder sterischer Hindernisse infolge zu dichter Molekülpackung nahezu unverändert bleibt (CANTARERO et al., 1980).

Als Substrat für die Bestimmung gebundener Enzymaktivität wurde 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in Verbindung mit H₂O₂ gewählt. Im Gegensatz zum bisher im Institut verwendeten ortho-Phenylendiamin wurde für TMB noch keine bzw. nur eine sehr geringe mutagene und kanzerogene Aktivität nachgewiesen (HOLLAND et al., 1974; GARNER et al., 1975). In der praktischen Anwendung erwies sich die Substratlösung nach GALLATI und PRACHT (1985) der nach BOS et al. (1981) überlegen.

Mit den zur Verfügung stehenden Reagenzien wurden dann drei unterschiedliche Sandwich-ELISA-Varianten entwickelt und auf ihre Eignung für den spezifischen SEE-Nachweis geprüft.

Die erste Variante, bei der Immunosorbens und Enzymkonjugat mit der gegen SEA absorbierten Fraktion IIa hergestellt wurden, folgte dem herkömmlichen Sandwich-ELISA-Ansatz zum Enterotoxinnachweis (LINZ, 1983; LOHNEIS, 1984; SCHREINER, 1985). Die zweite Variante, bei der Affinitätschromatographisch gereinigte SEE/A-Antikörper zur Herstellung des

Immunosorbens verwendet wurden, das Enzymkonjugat aber das gleiche war wie bei der ersten Variante, entsprach dem Sandwich-ELISA zum spezifischen Nachweis von SEE, wie er von THOMPSON et al. (1986) unter Einsatz monoklonaler Antikörper beschrieben wurde. Die dritte Variante war schließlich eine Umkehrung der zweiten: Das Immunosorbens war mit Hilfe der Fraktion IIa, das Enzymkonjugat mit SEE/A-Antikörpern angesetzt worden.

Die Ergebnisse der Spezifitätsuntersuchungen mit den gereinigten Enterotoxinen (SEA-SEE) und Kulturüberständen verschiedener enterotoxinogener, aber auch nichtenterotoxinogener *S. aureus*-Stämme führten zu folgender Beurteilung: Die erste Sandwich-ELISA-Variante ermöglichte zwar den spezifischen Nachweis von SEE, erbrachte aber bei Kulturüberständen auch falschpositive Resultate aufgrund von Reaktionen mit nicht bekannten Staphylokokken-Exoproteinen. Bei der zweiten Variante war unter Berücksichtigung der Daten von THOMPSON et al. (1986) nur der spezifische Nachweis von SEE erwartet worden, doch ergab sich ein falschpositives Ergebnis mit dem Kulturüberstand von *S. aureus*-Stamm 10-275 (SEB-Bildner). Die Ursache für diesen schwach positiven Befund konnte nicht abgeklärt werden. Die dritte Variante zeigte die gewünschte Spezifität für den SEE-Nachweis ohne falschpositive Ergebnisse. Sie wurde deshalb als Sandwich-ELISA zum SEE-Nachweis standardisiert. Ein entscheidender Vorteil der dritten Variante gegenüber der zweiten war der weitaus geringere Verbrauch an SEE/A-Antikörpern. Da bei der Herstellung des Immunosorbens die Beschichtung im Überschuß erfolgt, sind für die zweite Variante erheblich größere Mengen dieser nur begrenzt verfügbaren gemeinsamen Antikörper erforderlich als für die dritte, bei der das Enzymkonjugat außerdem in hoher Verdünnung angewendet werden konnte. Um die Situation zu verdeutlichen sei darauf hingewiesen, daß aus 230 ml Schafserum mit 18,4 g Serumprotein zwar 1,36 g gegen SEA absorbiertes anti-SEE-IgG (Fraktion IIa) gewonnen werden konnten, aber nur ca. 0,09 g SEE/A-Antikörper. Die von THOMPSON et al. (1986) erfolgreich

angewandte zweite Variante wurde aus diesen Erwägungen im übrigen von vornherein lediglich zum Vergleich mitgeführt. Deshalb wurde auch auf Versuche zur exakten Bestimmung der optimalen Beschichtungskonzentration für die SEE/A-Antikörper verzichtet.

Die Nachweisempfindlichkeit des standardisierten Tests betrug 0,1 ng/ml SEE in PBS. Sie lag also ungefähr im Bereich der unter gleichen Bedingungen von LOHNEIS (1984) und SCHREINER (1985) ermittelten Nachweisgrenzen von 0,15 ng/ml (SEB) bzw. 0,05 ng/ml (SEC₁). Für den Nachweis von SEE in Lebensmittelextrakten wies der von FREED et al. (1982) beschriebene ELISA eine Sensitivität von 0,2 ng/ml SEE auf. Eigene Untersuchungen von Lebensmitteln konnten bisher noch nicht vorgenommen werden. Es ist jedoch zu erwarten, daß die von SCHREINER (1985) beim Nachweis von SEC₁ aus Lebensmitteln erhaltenen Ergebnisse bezüglich Nachweisgrenze und Wiederfindungsraten auch mit dem für SEE entwickelten ELISA bestätigt werden können. Infolgedessen dürfte die von BERGDOLL (1979) für den SE-Nachweis geforderte Sensitivität von 0,1 µg SE pro 100 g Lebensmittel erfüllt werden.

Es konnte somit gezeigt werden, daß affinitätschromatographisch isolierte, hochspezifische SEE/A-Antikörper als Enzymkonjugat in Kombination mit dem gegen SEA absorbierten anti-SEE-Schaf IgG im Sandwich-ELISA einen spezifischen SEE-Nachweis ermöglichen. Dies wäre auf dem herkömmlichen Weg unter alleiniger Verwendung des anti-SEE-Schaf IgG nicht zu erreichen gewesen.

Mit Hilfe der über die Affinitätschromatographie gewonnenen Antikörper ist es somit möglich das bestehende ELISA-Testsystem für den SE-Nachweis so weit zu komplettieren, daß alle bisher bekannten SE-Typen erfaßt werden können. Mit dem von FEY et al. (1984) entwickelten und kommerziell vertriebenen EIA lassen sich bisher nämlich nur die Enterotoxine SEA bis SED nachweisen.

Da von den affinitätschromatographisch isolierten SEE/A-Antikörpern zur Konjugatherstellung nur ein kleiner Teil gebraucht wurde, und die Reinigung von SEE nach dem konventionellen Verfahren unbefriedigend war, eröffnete sich die Möglichkeit, eine andere Verwendung zu erproben: In Anlehnung an die Arbeiten von GENIGEORGIS und KUO (1976) sowie KUO und GENIGEORGIS (1978) zur Isolierung von SEB bzw. SEA und SEB wurden SEE/A-Antikörper an Sepharose gekoppelt, um aus Kulturüberstand des spezifisch SEE produzierenden *S. aureus* Stammes FRI 326 das Toxin in einem Einschnitt-Verfahren zu isolieren.

Zur Herstellung der Matrix wurden 3,5 mg Antikörper pro ml Sepharose (insgesamt 53 mg) eingesetzt, um einerseits eine möglichst vollständige Kopplung zu erzielen und andererseits eine hinreichende Ligandendichte zu erhalten. Die Wahl der Bedingungen erfolgte aufgrund einer Abschätzung, da der Hersteller der verwendeten Matrix (aktivierte CH-Sepharose 4B) keine maximale Bindungskapazität für IgG angeben konnte. Entsprechende Angaben bei GENIGEORGIS und KUO (1976) - 7,5 mg/ml -, COMOGLIO et al. (1976) - 48,96 mg/ml - und NISHIKAWA (1983) - 30 mg/ml - bezogen sich auf von den Autoren selbst mit CNBr aktivierte 4%ige Sepharose bzw. Agarose und waren allenfalls als Orientierung brauchbar. Die später ermittelte Kopplungsrate von mehr als 99 % weist aber daraufhin, daß die Bedingungen optimal abgeschätzt waren.

Der mit dem "sac-culture"-Verfahren nach DONNELLY et al. (1967) hergestellte Kulturüberstand enthielt nur ca. 0,01 mg/ml SEE, mußte aber aufgrund eines Gesamtproteingehaltes von 24,5 mg/ml 1:2 verdünnt werden (Vermeidung von Proteinaggregationen), bevor er die Säule passieren konnte. Dennoch wurde der SEE-Gehalt während der Passage der Säule um 99,99 % reduziert, was auch die Ligandendichte als ausreichend auswies. GENIGEORGIS und KUO (1976) konnten mit einer aus ökonomischen Überlegungen vorgenommenen Begrenzung auf 0,5 mg IgG pro ml Sepharose über 95 % des SEB aus Pufferlösungen absorbieren.

Für die Bindungskapazität der Matrix ergibt sich bei 53 mg gebundener SEE/A-Antikörper (Molgewicht 160.000 D) theoretisch ein Maximum von 20 mg SEE (Molgewicht 30.000 D), wenn man annimmt, daß ein Antikörpermolekül zwei Toxinmoleküle binden kann. Tatsächlich lag die maximale Bindungskapazität für SEE jedoch bei 5 mg SEE pro Lauf. Diese Diskrepanz zwischen theoretischer und tatsächlicher Bindungskapazität beobachteten in etwa der gleichen Größenordnung auch GENIGEORGIS und KUO (1976). Sie erklärt sich daraus, daß aktivierte CH-Sepharose 4B freie Aminogruppen ankoppelt, somit die Antikörper in einer zufälligen Weise gebunden werden und infolgedessen die Antigenbindungsstellen nur zum Teil verfügbar sind.

Das mit Glycin-HCl-Puffer, pH 2,8, abdissoziierte SEE wurde, um Schädigungen durch das pH-Milieu zu vermeiden, umgehend gegen PBS, pH 7,2, dialysiert. Dabei konnten im Gegensatz zu ENDE et al. (1983), die bei SEB und SEC₁ über Toxinverluste bis zu 80 % bei der Dialyse berichteten, nur solche in Höhe von 10-15 % festgestellt werden.

Bei der Analyse des gereinigten SEE zeigte sich, daß eine vollständige Reinheit nicht bei allen affinitätsgereinigten Präparationen gegeben war. Bei manchen Präparationen traten in der SDS-PAGE zusätzliche schwache Banden höhermolekularen Materials (ca. 45.000 bzw. 60.000 D) auf. Diese waren aber schon bei einer Herabsetzung der Probenkonzentration von 2 mg/ml auf 1 mg/ml nicht mehr sichtbar zu machen. Die Banden konnten bezüglich ihrer Natur nicht charakterisiert werden. Möglicherweise handelt es sich bei dem Material mit einem Molgewicht von ca. 60.000 D um ein Exoprotein von *S. aureus*, das schon in der SEA-Präparation (BERGDOLL) vorhanden war, die zur Antikörperisolierung verwendet wurde (Abb. 28a). Diese Bande kann jedoch auch durch lagerungsbedingte Toxindimere verursacht worden sein (BERGDOLL, 1987). Das Material mit einem Molgewicht von ca. 45.000 D ist unter Umständen Protein A, das an IgG₂ der SEE/A-Antikörper adsorbiert wurde. Zur Klärung bedarf es weiterer Untersuchungen.

Bei der mit den entsprechenden SEE-Präparationen anschließend durchgeführten Gelfiltration an Sephadex G-50 wurden drei Peaks erhalten. SEE war im mittleren Peak (B) vorhanden, konnte von den beiden anderen Peaks (A und C) gut abgetrennt werden und lag in reiner Form (eine Bande in der SDS-PAGE) vor. Der Peak A war größer als man entsprechend der SDS-PAGE erwarten durfte. Das rührt daher, daß sämtliches Material, das größer ist als 30.000 D, als ein Peak im Ausschlußvolumen der Säule eluiert. Zur Größe des Peaks trugen offensichtlich auch Kontaminationen bei, die in der SDS-PAGE gar nicht sichtbar waren. Der Peak C enthielt niedermolekulare Bestandteile, die ebenfalls in der SDS-PAGE nicht aufgetreten waren.

Die Ergebnisse der isoelektrischen Fokussierung (IEF) ließen eine sehr ausgeprägte Mikroheterogenität des affinitätsgereinigten SEE erkennen. Insgesamt waren 17 differenzierbare Banden mit isoelektrischen Punkten zwischen pH 8,0 und pH 5,5 nachweisbar. Die stärkste Bande fokussierte bei pH 7,6, weitere kräftige Banden lagen bei pH 7,8, 7,2, 6,8 und 6,6. ODA (1980) hatte bei von ihm gereinigtem SEE fünf isoelektrische Punkte (8,5, 8,0 - Hauptkomponente - , 7,6, 7,4 und 7,0) gefunden. Aus dieser Mikroheterogenität erklären sich die Schwierigkeiten bei der Auswahl der zu poolenden Fraktionen bei der Reinigung nach herkömmlichen Verfahren. Das hauseigene mittels Chromatofokussierung gereinigte SEE zeigte z. B. nur wenige Banden im basischen Bereich (pH 8,0, 7,8 und 7,6). Die stärkere Ausprägung dieser Banden im Vergleich zum erstmals in natürlicher Vielfalt vorliegenden affinitätsgereinigten SEE ist auf die starke Anreicherung bestimmter SEE-Komponenten durch die Chromatofokussierung in einem engen pH-Intervall zurückzuführen. Daraus wird deutlich, daß die Chromatofokussierung für die Reinigung eines derart heterogenen Materials wie SEE nicht die Methode der Wahl ist.

Für die praktische Durchführung der affinitätschromatographischen Reinigung von SEE sei abschließend darauf hingewiesen, daß es bei der direkten Isolierung von SEE aus

Kulturüberstand zu unspezifischen Proteinadsorptionen an die Sepharose kommt. Infolgedessen wird die Säulenmatrix von Lauf zu Lauf stärker verfärbt und verschmutzt; durch die fortschreitende Verschmutzung der Säulenmatrix nimmt die Brauchbarkeit der Säule ab, so daß sie nach ca. 20-30 Läufen unbrauchbar ist. Auch in Schläuchen und Dreiwegehähnen kommt es zu Proteinan- und -ablagerungen. Letzteres läßt sich durch Spülungen mit Puffer zwischen zwei Läufen beseitigen, die Säulenmatrix dagegen ist auch durch intensives Waschen nicht mehr in den Ausgangszustand zurückzusetzen. Diese unspezifischen Adsorptionen sind nach HOFSTEE (1974), TURKOVA, (1978) und JENISSEN (1983) zumeist irreversibel. Spülungen der Matrix mit stärker konzentriertem (z. B. 2 mol/l) Harnstoff oder Guanidin-HCl, mit denen eine bessere Desorption erreicht werden könnte, verbieten sich, weil dadurch die gebundenen Antikörper geschädigt werden (KRISTIANSEN, 1978). Zur Herstellung einer neuen Säulenmatrix müßte aber eine ausreichende Menge an SEE/A-Antikörpern vorhanden sein, und diese können nur in begrenztem Umfang hergestellt werden. Es ist also wichtig, die Säulenmatrix so weit als möglich zu schonen. Durch das Vorschalten einer Säule mit nichtsubstituierter Sepharose, die als "Schmutzfänger" fungierte, konnte die Verschmutzung der Absorptionssäule nicht verhindert, sondern lediglich verringert werden. Als weitaus besser erwies sich eine Vorreinigung des SEE-haltigen Kulturüberstandes, z. B. über SP-Sephadex. Die bei den Experimenten zur Reinigung von SEE gewonnenen Erfahrungen lassen auch entsprechende Versuche bei SEA und SED als sinnvoll erscheinen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

I.

In Fortführung bisheriger Arbeiten des Instituts über den enzymimmunologischen Nachweis (ELISA) von Staphylokokken-Enterotoxinen (SE) wurde zuerst ein Sandwich-Verfahren für den Nachweis des Typ E (SEE) entwickelt.

Nach Immunisierung von Schafen mit SEE wurde ein polyvalentes Antiserum gewonnen, aus dem durch Immunaффinitätschromatographie an SEA-Sepharose eine Fraktion von Antikörpern isoliert wurde, die gegen ein gemeinsames Epitop von SEE und SEA gerichtet sind (SEE/A-Antikörper). Außerdem wurde aus dem gegen SEA absorbierten Serum nach Ammoniumsulfatfällung durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Trisacryl M anti-SEE-Schaf IgG₁ isoliert. Zur Enzymmarkierung der beiden Antikörperfraktionen wurde Meerrettichperoxidase (HRP) verwendet. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte anhand des Umsatzes von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin.

Drei durch unterschiedliche Kombination der SEE/A-Antikörper bzw. des IgG₁ mit den beiden Enzymkonjugaten erhaltene Sandwich-ELISA-Varianten wurden auf ihre Eignung zum spezifischen Nachweis von SEE geprüft. Dies erfolgte anhand der Untersuchung von Kulturüberständen enterotoxinogener und nichtenterotoxinogener *S. aureus*-Stämme und gereinigten SE. Die am besten geeignete Variante (Festkörperphase mit anti-SEE-Schaf IgG₁; Enzymkonjugat: SEE/A-Antikörper-HRP) wurde standardisiert und ermöglichte den Nachweis von 0,1 ng gereinigtem SEE/ml PBS innerhalb von drei Stunden. Kreuzreaktionen mit heterologen Kulturüberständen und anderen SE sowie unspezifische Reaktionen wurden nicht beobachtet.

II.

Durch Kopplung der SEE/A-Antikörper an aktivierte Sepharose wurde ein Immunosorbens hergestellt, das die direkte Isolierung von SEE aus dem Kulturüberstand in einem Einschritt-Verfahren ermöglichte. Das SEE wurde dabei mit einer Absorptionsrate von 99,99 % aus Kulturüberstand gewonnen, in dem es selbst mit einer Konzentration von etwa 0,01 mg/ml nur ca. 0,04 % der gelösten Bestandteile ausmachte.

Vereinzelte in der SDS-PAGE in geringen Konzentrationen nachweisbare höhermolekulare für SEE untypische Bestandteile waren durch Gelfiltration an Sephadex G-50 leicht abzutrennen.

Die bei dem Einschritt-Verfahren aufgrund der Adsorption von Proteinbestandteilen des Kulturüberstandes allmählich eintretende Verschmutzung der Säule kann durch Vorschaltung einer Ionenaustauschchromatographie vermieden werden.

SUMMARY STAPHYLOCOCCAL-ENTEROTOXIN E - DETECTION BY AN
 ELISA AND PURIFICATION UTILIZING AFFINITY PURIFIED
 ANTIBODIES

I.

In continuing previous investigations at this institute concerning the detection of staphylococcal enterotoxins (SE) by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) a sandwich-technique for the detection of type E (SEE) was developed. After immunization of sheep with SEE a polyvalent antiserum was produced and an antibody fraction to a common epitope on SEE and SEA (SEE/A-antibodies) was isolated by immuno-affinity chromatography on SEA-Sepharose. Moreover IgG₁ was isolated after ammoniumsulfate precipitation by ion-exchange chromatography on DEAE-Trisacryl M from the antiserum absorbed against SEA.

Horseradish peroxidase (HRP) was used for enzyme-labelling of the two antibodies. The activity of the enzyme was determined with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as substrate. Three variants of the sandwich-ELISA resulting from different combinations of SEE/A-antibodies and IgG₁ with the two enzyme conjugates were tested for their suitability to detect SEE specifically. This was done by testing culture supernatants of enterotoxigenic and nonenterotoxigenic *S. aureus* strains as well as purified SE. The most suitable combination (solid phase with anti-SEE-sheep IgG₁; enzyme conjugate: SEE/A-antibody-HRP) was standardized. This sandwich-ELISA allowed the detection of 0.1 ng purified SEE/ml PBS within three hours. Neither crossreactions with heterologous culture supernatants and other types of SE nor unspecific reactions were registered.

II.

A solid-phase was produced by coupling SEE/A-antibodies to activated Sepharose, which enables the isolation of SEE from culture-supernatant in a one-step procedure. SEE could be extracted at a rate of 99.99 % from culture supernatant containing this toxin only in a concentration of about 0.01 mg/ml which represented 0.04 % of the dissolved components.

Substances of higher molecular weight untypical for SEE which could sometimes be detected in the SDS-PAGE could easily be removed by gel filtration on Sephadex G-50. The progressive pollution of the column in this one-step procedure caused by the adsorption of proteins from the culture supernatant can be eliminated by a preceding ion-exchange chromatography.

6 LITERATUR

ADESIYUN, A.A. (1984):

Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from nigerian ready-to-eat foods.

J. Food Prot. 47, 438-440

ADESIYUN, A.A., I. RAJI und V. YOBE (1986):

Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* from anterior nares of dining hall workers.

J. Food Prot. 49, 955-957

BAUTZ, E.K.F. und B.D. HALL (1962):

The isolation of T₄-specific RNA on a DNA-cellulose column.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 48, 400-408

BECKERS, H.J. (1986):

Incidence of foodborne disease in the Netherlands: Annual summary - 1981.

J. Food Prot. 49, 924-931

BERGDOLL, M.S. (1979):

Staphylococcal intoxications.

in: RIEMANN, H. und F.L. BRYAN: Food-borne infections and intoxications, 2. Aufl., p. 443-494

Academic Press, New York, San Francisco und London

DERSELBE (1983):

Enterotoxins.

in: EASMON, C.S.F. und G. ADLAM: *Staphylococci and staphylococcal infection*, Vol. 2 (The organism in vivo and in vitro), p. 559-598

Academic Press Inc., London

DERSELBE (1987):

Persönliche Mitteilung.

BERGDOLL, M.S. und P.M. SCHLIEVERT (1984):

Toxic shock syndrome toxin-one.

Am. Soc. Microbiol. News 50, 525

BERGDOLL, M.S., J.K. CZOP und S.S. GOULD (1974a):

Enterotoxin synthesis by the staphylococci.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 236, 307-316

BERGDOLL, M.S., I.-Y. HUANG UND E.J. SCHANTZ (1974b):

Chemistry of the staphylococcal enterotoxins.

J. Agr. Food Chem. 22, 9-13

BERGDOLL, M.S., C.R. BORJA, R.N. ROBBINS und K.F. WEISS

(1971):

Identification of enterotoxin E.

Infect. Immun. 4, 593-595

BERGDOLL, M.S., I.-Y. HUANG, F.S. CHU und C.R. BORJA (1969):

The chemistry of bacterial toxins: The staphylococcal enterotoxins.

J. van die Suid-Afrikaanse Chem. Institut 22, 99-105

BERGDOLL, M.S., F.S. CHU, I.-Y. HUANG, C. ROWE und T. SHIH (1965):

Staphylococcal enterotoxin B. III. The physicochemical properties and the N- and C-terminal amino acid sequences.

Arch. Biochem. Biophys. 112, 104-110

BOLTON, E.T. und B.J. MCCARTHY (1962):

A general method for the isolation of RNA complementary to DNA.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 48, 1390-1397

BORJA, C.R., E. FANNING, I.-Y. HUANG und M.S. BERGDOLL (1972):

Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin E.

J. Biol. Chem. 247, 2456-2463

BOS, E.S., A.A. van der DOELEN, N. van ROOY und A.H.W.M. SCHUURS (1981):

3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as an ames test negative chromogen for horse-radish peroxidase in enzyme-immunoassay.

J. Immunoassay, 2, 187-204

CAMPBELL, D.H., E. LUESCHER und L.S. LERMAN (1951):

Immunologic adsorbents. I. Isolation of antibody by means of a cellulose-protein antigen.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 37, 575-578

CANTARERO, L. A., J.E. BUTLER und J.W. OSBORNE (1980):

The adsorptive characteristics of proteins for polystyrene and their significance in solid-phase immunoassays.

Anal. Biochem. 105, 375-382

CASMAN, E.P. und R.W. BENNETT (1964):

Production of antiserum for staphylococcal enterotoxin.

Appl. Microbiol. 12, 363-367

CASMAN, E.P., M.S. BERGDOLL und J. ROBINSON (1963):

Designation of staphylococcal enterotoxins.

J. Bact. 85, 715-716

CHANG, H.-C. und M.S. BERGDOLL (1979):

Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin D.

Biochemistry 18, 1937-1942

CHANG, P.-C. und N. DICKIE (1971):

Heterogeneity of staphylococcal enterotoxin B.
Can. J. Microbiol. 17, 1479-1481

COMOGLIO, S., A. MASSAGLIA, E. ROLLERI und U. ROSA (1976):
Factors affecting the properties of insolubilized
antibodies.

Biochim. Biophys. Acta 420, 246-257

COOPER, T.G. (1981):

Biochemische Arbeitsmethoden, p. 223
Walter de Gruyter, Berlin und New York

CROOK, N.E., J. STEPHEN und H. SMITH (1972):

Recovery of bound homologous protein antigens from
disulphide-linked immunosorbents at neutral pH.
Immunochemistry 9, 945-960

CUATRECASAS, P. (1972):

Affinity chromatography of macromolecules.
in: MEISTER, A.: Advances in enzymology, p. 29-89
John Wiley, New York

CUATRECASAS, P. und C.B. ANFENSEN (1971):

Affinity chromatography.
in: JAKOBY, W.B.: Methods in enzymology 22, p. 345-378
Academic Press, New York

CUATRECASAS, P., M. WILCHEK und C.B. ANFENSEN (1968):

Selective enzyme purification by affinity chromatography.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 61, 636-643

DANDLIKER, W.B. und V.A. de SAUSSURE (1971):

Stabilization of makromolecules by hydrophobic bonding: Role
of chaotropic ions.

in: HAIR, M.: The chemistry of biosurfaces. Vol. I. p. 1-43
Marcel Dekker, New York

DANGERFIELD, H.G. (1973):

Effect of enterotoxins after ingestion by humans.

Vortrag, Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol.

DAVID, G.S., T.H. CHINO und R.A. REISFELD (1974):

Binding of proteins to CNBr-activated Sepharose 4B.

FEBS Letters 43, 264-266

DONNELLY, C.B., J.E. LESLIE, L.A. BLACK und K.H. LEWIS

(1967):

Serological identification of enterotoxigenic staphylococci from cheese.

Appl. Microbiol. 15, 1382-1387

EDWIN, C., S.R. TATINI und S.K. MAHESWARAN (1986):

Specificity and cross-reactivity of staphylococcal enterotoxin A monoclonal antibodies with enterotoxins B, C₁, D and E.

Appl. Environ. Microbiol. 52, 1253-1257

EDWIN, C., S.R. TATINI, R.S. STROBEL und S.K. MAHESWARAN

(1984):

Production of monoclonal antibodies to staphylococcal enterotoxin A.

Appl. Environ. Microbiol. 48, 1171-1175

ENDE, I.A., G. TERPLAN, B. KICKHÖFEN und D.K. HAMMER (1983):

Chromatofocusing: A new method for purification of staphylococcal enterotoxins B and C₁.

Appl. Environ. Microbiol. 46, 1323-1330

ENGVAL, E. und P. PERLMANN (1972):

Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III.

Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes.

J. Immunol. 109, 129-135

FEY, H. (1982):

Newer concepts for the detection of staphylococcus enterotoxins by ELISA.

in: WARDLEY, R.C. und J.R. CROWTHER: The ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay in veterinary research and diagnosis, p. 83-89

Martinus Nijhof Publ., The Hague

FEY, H., H. PFISTER und O. RÜEGG (1984):

Comparative evaluation of different ELISA systems for the detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, and D.

J. Clin. Microbiol. 19, 34-38

FEY, H., G. STIFFLER-ROSENBERG, G. WARTENWEILER-BURKARD, C. MÜLLER und O. RÜEGG (1982):

Der Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen (SET).

Schweiz. Arch. Tierheilk. 124, 297-306

FREED, R.C., M.L. EVENSON, R.F. REISER und M.S. BERGDOLL (1982):

Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods.

Appl. Environ. Microbiol. 44, 1349-1355

GALLATI, H. und I. PRACHT (1985):

Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H_2O_2 und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin.

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 23, 453-460

GARNER, R.C., A.L. WALPOLE und F.L. ROSE (1975):

Testing of some benzidine analogues for microsomal activation to bacterial mutagens.

Cancer Letters 1, 39-42

GRABAR, P und C.A. WILLIAMS (1953):

Methode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au serum sanguin.

Biochim. Biophys. Acta 10, 193-194

GENIGEORGIS, C. und J.K. KUO (1976):

Recovery of staphylococcal enterotoxin from foods by affinity chromatography.

Appl. Environ. Microbiol. 31, 274-279

GILBERT, R.J. (1974):

Staphylococcal food poisoning and botulism.

Postgraduate Medical Journal 50, 603-611

GÖRG, A., W. POSTEL und R. WESTERMEIER (1979):

Ultradünnschicht-isoelektrische Fokussierung und Ultradünnschicht-Elektrophorese in Polyacrylamidgel auf Folie.

Labor-Medizin 2, 32-40

GÖRG, A., W. POSTEL und R. WESTERMEIER (1982):

SDS electrophoresis of legume seed proteins in horizontal ultrathin-layer pore gradient gels.

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 174, 282-285

GÖRG, A., W. POSTEL, R. WESTERMEIER, P.G. RIGHETTI und K. EK (1981):

One and two dimensional electrophoresis performed horizontally in ultrathin SDS pore-gradient gels.

LKB Application Note 320; Bromma Schweden

HAMAGUCHI, K. und E.P. GEIDUSCHEK (1962):

The effect of electrolytes on the stability of the deoxyribonucleate helix.

J. Amer. Chem. Soc. 84, 1329-1338

HARTUNG, S. (1986):

Zur Produktion und Reinigung von Staphylokokken-
Enterotoxin D.

Vet. Med. Diss. München

HEBERT, G.A., P.L. PELHAM UND B. PITTMAN (1973):

Determination of the optimal ammonium sulfate concentration
for the fractionation of rabbit, sheep, horse and goat
antisera.

Appl. Microbiol. 25, 25-36

HOFSTEE, B.H.J. (1974):

Non-specific binding of proteins by substituted agaroses.
In: DUNLAP, R.B. (ed.): Immobilized biochemicals and
affinity chromatography, p. 43-59

Plenum Press, New York

HOLLAND, V.R., B.C. SAUNDERS, F.L. ROSE und A.L. WALPOLE
(1974):

A safer substitute for benzidine in detection of blood.
Tetrahedron 30, 3299-3302

HOLMBERGH, O. (1933):

Über die Adsorption von alpha-Amylase aus Malz an Stärke.
Biochem. Z. 258, 134-140

HUANG, I.-Y., T. SHIH, C.R. BORJA, R.M. AVENA und M.S.
BERGDOLL (1967):

Amino acid composition and terminal amino acids of
staphylococcal enterotoxins C.

Biochemistry 6, 1480-1483

IGARASHI, H., H. FUJIKAWA, H. USAMI, S. KAWABATA und T.
MORITA (1984):

Purification and characterization of Staphylococcus aureus
FRI 1169 and 587 toxic-shock syndrome enterotoxins.

Infect. Immun. 44, 175-181

JENISSEN, H.P. (1983):

Protein adsorption hysteresis on hydrophobic agaroses.

In: CHAIKEN, I.M., M. WILCHEK und I. PARIKH (eds.): Affinity chromatography and biological recognition, p. 281-290

Academic Press, New York

JOZEF CZYK, Z., R.N. ROBBINS, J.M. SPITZ und M.S. BERGDOLL (1980):

Antibodies to staphylococcal enterotoxin in laboratory personnel.

J. Clin. Microbiol. 11, 438-439

KARSCH, W. und U. RICHTER (1979):

Reinigung der Staphylokokken-Enterotoxine A - E.

Z. ges. Hyg. 25, 613-615

KARUSH, F. (1963):

Immunologic specificity and molecular structure.

Adv. Immunol. 2, 1-40

KESSLER, S.W. (1976):

Cell membrane antigen isolation with the staphylococcal protein A antibody adsorbent.

J. Immunol. 117, 1482-1490

KOKAN, N.P. und M.S. BERGDOLL (1987):

Detection of low-enterotoxin-producing Staphylococcus aureus strains

Appl. Environ. Microbiol. 53, 2675-2676

KRISTIANSEN, T. (1974):

Studies on blood group substances. V. Blood group substance A coupled to Sepharose as an immunosorbent.

Biochim. Biophys. Acta 362, 567-574

DERSELBE (1978):

Matrixbound antigens and antibodies.

in: HOFFMANN-OSTENHOF, O., M. BREITENBACH, F. KOLLER, D. KRAFT und O. SCHEINER,: Affinity chromatography, p. 191-206
Pergamon Press, Oxford

KUO, J.K. und C. GENIGEORGIS (1978):

Purification of staphylococcal enterotoxin A and B by
affinity chromatography.

Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol. (P47) 194

LACHICA, R.V.F., K.F. WEISS und R.H. DEIBEL (1969):

Relationships among coagulase, enterotoxin and heat-stable
deoxyribonuclease production by *Staphylococcus aureus*.

Appl. Microbiol. 18, 126-127

LEE, A.C.M., R.N. ROBBINS und M.S. BERGDOLL (1978):

Isolation of specific and common antibodies to
staphylococcal enterotoxins A and E by affinity
chromatography.

Infect. Immun. 21, 387-391

LEE, A.C.M., R.N. ROBBINS, R.F. REISER und M.S. BERGDOLL
(1980):

Isolation of specific and common antibodies to
staphylococcal enterotoxins B, C₁, and C₂.

Infect. Immun. 27, 431-434

LELOIR, L.F. und S.H. GOLDEMBERG (1960):

Synthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose in
liver.

J. Biol. Chem. 235, 919-923

LERMAN, L.S. (1953):

A biochemically specific method for enzyme isolation.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 39, 232-236

LEVISON, S.A., F. KIERSZENBAUM und W.B. DANDLIKER (1970):
Salt effects on antigen-antibody kinetics.
Biochemistry 9, 322-331

LIM, Y.S., M. JEGATHESAN und A.S. KOAY (1982):
Enterotoxin production by staphylococcus aureus strains
isolated from humans, foods and animals in Malaysia.
Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth. 13, 133-137

LINZ, G. (1983):
Untersuchungen zur Ratioalisierung enzymimmunologischer
Nachweise von Staphylokokken-Enterotoxinen am Beispiel des
Typ B.
Vet. Med. Diss. München

LOHNEIS, M. (1984):
Der lumineszenzimmunologische Nachweis von Staphylokokken-
Enterotoxin B im Vergleich zum enzymimmunologischen.
Vet. Med. Diss. München

LOTTER, L.P. und C.A. GENIGEORGIS (1975):
Deoxyribonucleic acid base composition and biochemical
properties of certain coagulase-nrgative enterotoxigenic
cocci.
Appl. Microbiol. 29, 152-158

DIESELBEN (1977):
Isolation of cagulase-positive variants from coagulase-
negative enterotoxigenic staphylococci.
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 239, 18-30

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR und R.J. RANDALL
(1951):
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275

MAUFF, G., I. RÖHRIG, U. ERNZER, W. LENZ, M. BERGDOLL und G. PULVERER (1983):

Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains from clinical isolates.

Eur. J. Clin. Microbiol. 2, 321-326

MAYER, S. (1975):

Enterotoxinbildungsvermögen boviner und humaner Staphylokokken unter Berücksichtigung der Antibiotikaresistenz und anderer biologischer Eigenschaften.

Vet. Med. Diss. München

METZGER, J.F., A.D. JOHNSON und W.S. COLLINS (1972):

Fractionation and purification of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B by electrofocusing.

Biochim. Biophys. Acta 257, 183-186

METZGER, J.F., A.D. JOHNSON und L. SPERO (1975):

Intrinsic and chemically produced microheterogeneity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin type C.

Infect. Immun. 12, 93-97

MEYER, R.F., L. MILLER, R.W. BENNETT und J.D. MACMILLAN (1984):

Development of a monoclonal antibody capable of interacting with five serotypes of *Staphylococcus aureus* enterotoxin.

Appl. Environ. Microbiol. 47, 283-287

MOCHMANN, H., A.K. AKATOV, M.L. KHATENEVER, U. RICHTER, I.W. KUSCHKO und W. KARSCH (1981):

Studies on enterotoxin production by strains of *staphylococcus* of different origin obtained from USSR. in: JELJASZEWICZ, J.: *Staphylococci and staphylococcal infections*, Zbl. Bakt. Suppl. 10 p. 377-380

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart und New York

MOHR, P. und K. POMMERENNING (1985):

Affinity chromatography.

Marcel Dekker, New York

MORITA, T.N., J.E. PATTERSON und M.J. WOODBURN (1979):

Magnesium and iron addition to casein hydrolysate medium for production of staphylococcal enterotoxins A, B, and C.

Appl. Environ. Microbiol. 38, 39.42

MÜLLER, H., H. PUPPEL, W. MANNHEIM, H. DAJANI und U. v. AHN (1973):

Fäkale Trägersrate und Enterotoxinbildungsvermögen von Staphylococcus aureus beim Menschen.

Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 223, 180-196

NISHIKAWA, H.A. (1983):

Introduction to affinity purification of biopolymers.

in: SCOUTEN, W.H.: Solid phase biochemistry, p. 17-78

John Wiley, New York

NIYOMVIT, N., K.E. STEVENSON und R.F. McFEETERS (1978):

Detection of staphylococcal enterotoxin B by affinity radioimmunoassay.

J. Food Sci. 43, 735-739

NOTERMANS, S. (1982):

Detection of staphylococcal enterotoxins (SE) with special reference to the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

in: CORRY, J.E.L., D. ROBERTS und F.A. SKINNER: Isolation and identification methods for food poisoning outbreaks, p. 199-209

Academic Press, London

NOTERMANS, S., P. TIPS und K.J. HENVELMANN (1984b):

Einfluß der Milieu-Bedingungen auf das Wachstum von S. aureus und die Enterotoxin-Bildung.

Fleischwirtschaft. 64, 1490-1496

NOTERMANS, S., R. BOOT, H. HAAS und R.A. DRIEDONKS (1984a):
Relation between immunological and biological activity of
Staphylococcus aureus enterotoxin A in food upon different
treatment.

Unveröffentlichtes Manuskript

NOTERMANS, S., W.J. van LEEUWEN, J. DUFRENNE und P.D. TIPS
(1983):

Serum antibodies to enterotoxins produced by Staphylococcus
aureus with special reference to enterotoxin F and toxic
shock syndrome.

J. Clin. Microbiol. 18, 1055-1060

NOTERMANS, S., H.L. VERJANS, J. BOL und M. van SCHOTHORST
(1978):

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determination
of Staphylococcus aureus enterotoxin type B.

Health Lab. Sci. 15, 28-31

ODA, T. (1980):

Application of SP-Sephadex chromatography to the
purification of staphylococcal enterotoxin D and E.

Jpn. J. Bact. 35, 559-566

OSVÁTH-MARTON, A., E. BAN und L. MOLNÁR (1981):

Occurrence of enterotoxin-producing Staphylococcus aureus
strains in enterocolitis of children.

in: JELJASZEWICZ, J.: Staphylococci and staphylococcal
infections, Zbl. Bact. Suppl. 10 p. 975-980

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York

OTHMAN, Y.M. und E. MAY (1981):

The occurrence and significance of enterotoxigenic
staphylococci on raw beef.

in: JELJASZEWICZ, J.: Staphylococci and staphylococcal
infections, Zbl. Bakt. Suppl. 10 p. 1033-1038

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York

OUCHTERLONY, Ö. (1948):

Antigen-antibody reactions in gels.

Arch. Kemi. Min. Geol. 26, B, 1

PALASUNTHERAM, C. und M.S. BEAUCHAMP (1982):

Enterotoxigenic staphylococci in Sri Lanka.

J. Appl. Bacteriol. 52, 39-41

PANDURANGARAO, C.C. (1977):

Enterotoxigenic staphylococci in milk.

Indian J. Microbiol. 17, 105-107

PAYNE, D.N. und J.M. WOOD (1974):

The incidence of enterotoxin production in strains of Staphylococcus aureus isolated from foods.

J. Appl. Bact. 37, 319-325

PETRÁŠ, P. und L. MAŠKOVA (1980):

Detection of staphylococcal enterotoxigenicity. II. Field strains.

Journal of Hygiene, Epidemiology and Microbiology and Immunology 24, 177-182

PETRÁŠ, P. und L. MAŠKOVA (1982):

Detection of staphylococcal enterotoxigenicity. III. Strains isolated in 1979 - 1980.

Journal of Hygiene, Epidemiology and Microbiology and Immunology 26, 95-101

POLLEDO, J.J.F., M.L. GARCIA, B. MORENO und I. MENES (1985):

Importance of food handlers as a source of enterotoxigenic staphylococci.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 181, 364-373

RAJALAKSHMI und K. RAJYALAKSHMI (1982):

Types of enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from cases of poisoning.

Indian J. Med. Res. 76, 127-129

RAŠKA, K., V. MATEJOVSKA, M.S.BERGDOLL und P.PETRAS (1981):
To the origin of contamination of foodstuffs by enterotoxigenic staphylococci.

in: JELJASZEWICZ, J.: Staphylococci and staphylococcal infections, Zbl. Bakt. Suppl. 10 p. 381-385

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York

REISER, R.F., R.N. ROBBINS, G.P. KHOE und M.S. BERGDOLL (1983):

Purification and some physicochemical properties of toxic shock toxin.

Biochem. 22, 3907-3912

REISER, R.F., R.N. ROBBINS, A.L. NOLETO, G.P. KHOE und M.S. BERGDOLL (1984):

Identification, purification, and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin C₃.

Infect. Immun. 45, 625-630

RICHTER, U. und W. KARSCH (1980):

Herstellung diagnostischer Antiseren zum Nachweis der Staphylokokken-Enterotoxine A - E.

Z. Ges. Hyg. 26, 53-55

RICHTER, U., W. WITTE, R. HUMMEL, W. KARSCH und H. MOCHMANN (1981):

Enterotoxin production and host specific variety of *Staphylococcus aureus* strains.

in: JELJASZEWICZ, J.: Staphylococci and staphylococcal infections, Zbl. Bakt. Suppl. 10 p. 1023-1027

Gustav Fischer Verlag Stuttgart, New York

ROBBINS, R.N. und M.S. BERGDOLL (1984):

Production of rabbit antisera to the staphylococcal enterotoxins.

J. Food Prot. 47, 172-176

ROBBINS, R.N., S. GOULD und M.S. BERGDOLL (1974)

Detecting the enterogenicity of Staphylococcus aureus strains.

Appl. Microbiol. 28, 946-950

SAIRAM, M.R., W.C. CLARK, D.CHUNG, J. PORATH und C.H. LI (1974):

Purification of antibodies to protein hormones by affinity chromatography on divinylsulfonyl Sepharose.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 61, 355-359

SCHANTZ, E.J., W.G. ROESSLER, M.G. WOODBURN, J.M. LYNCH, H.M. JAKOBY, S.J. SILVERMAN, J.C. GORMAN und L. SPERO (1972):

Purification and some chemical and physical properties of staphylococcal enterotoxin A.

Biochemistry 11, 360-366

SCHEUBER, P.H., J.R. GOLECKI, B. KICKHÖFEN, D. SCHEEL, G.BECK und D.K. HAMMER (1985):

Skin reactivity of unsensitized monkeys upon challenge with staphylococcal enterotoxin B: A new aproach for investigating the site of toxin action.

Infect. Immun. 50,

SCHNEIDER, C., R.A. NEWMAN, D.R. SUTHERLAND, U. ASSER und M.F.GREAVES (1982):

A one-step purification of a high efficiency immunomatrix.

J. Biol. Chem. 257, 10766-10769

SCHREINER, H. (1985):

Zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen am Modell des Typ C₁ mit dem Sandwich-ELISA.

Vet. Med. Diss. München

SCOUTEN, W.H. (1981):

Affinity chromatography.

John Wiley, New York

SHINAGAWA, K., N. KUNITA und G. SAKAGUCHI (1977):

Purification of staphylococcal enterotoxin E and antigenic similarity between enterotoxin A and E.

Jpn. J. Bacteriol. 32, 829-836

SIMON, E. (1977):

Verfahren zum schnellen und empfindlichen Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin in Lebensmitteln am Modell des Enterotoxins B nach dem ELISA-Prinzip.

Vet. Med. Diss. München

SIMON, E. UND G. TERPLAN (1977):

Nachweis von Staphylokokken Enterotoxin B mittels ELISA-Test.

Zbl. Vet. Med. B 24, 842-844

SOMMERFELD, P. und G. TERPLAN (1975):

Methoden zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen. Arch. Lebensmittelhyg. 26, 128-137

ŠOUREK, J. (1980):

Circulation of enterotoxigenic strains of Staphylococcus aureus in humans and their environment.

Journal of Hygiene, Epidemiology and Microbiology and Immunology 24, 183-191

SPERO, L., J.R. WARREN und J.F. METZGER (1974):
Microheterogeneity of staphylococcal enterotoxin B.
Biochim. Biophys. Acta 336, 79-85

STELMA, G.N., jr. und M.S. BERGDOLL (1982):
Inactivation of staphylococcal enterotoxin A by chemical
modification.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 105, 121-126

SURGALLA, M.J., M.S. BERGDOLL und G.M. DACK (1953):
Some observations on the assay of staphylococcal enterotoxin
by the monkey-feeding test.
J. Lab. Clin. Med. 41, 782-788

TERAYAMA, T., S. YAMADA, H. IGARASHI, H. USHIODA und H.
ZEN-YOJI
(1974):
Purification of staphylococcal enterotoxin E.
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H. 25, 9-15

TERAYAMA, T., S. YAMADA, M. INABA, H. IGARASHI, H. USHIODA
und H. ZEN-YOJI (1976):
Purification of anti-staphylococcal enterotoxin serum by
affinity chromatography.
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H. 27-1, 5-9

TERPLAN, G. (1982):
Unveröffentlichte Mitteilung

TERPLAN, G. und K.-J. ZAADHOF (1981):
Inaktivierung von Staphylokokken-Enterotoxinen.
Unveröffentlichtes Manuskript

THAYER, P.S. (1953).
The amylases of pseudomonas saccharophila.
J. Bacteriol. 66, 656-663

THOMPSON, N.E., M.J. KETTERHAGEN und M.S. BERGDOLL (1984):
Monoclonal antibodies to staphylococcal enterotoxins B and
C: Cross-reactivity and localization of epitopes on tryptic
fragments.

Infect. Immun. 45, 281-285

THOMPSON, N.E., M. RAZDAN, G. KUNTSMANN, J.M. ASCHENBACH,
M.L. EVENSON und M.S. BERGDOLL (1986):

Detection of staphylococcal enterotoxins by enzyme-linked
immunosorbent assays and radioimmunoassays: Comparison of
monoclonal and polyclonal antibody systems.

Appl. Environ. Microbiol. 51, 885-890

THOTA, H., S.R. TATINI und R.W. BENNETT (1973):

Effects of temperature, pH and NaCl on production of
staphylococcal enterotoxins E and F.

Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol. (El) p. 1

TODD, E.C.D. (1987):

Foodborne and waterborne disease in Canada 1980 - Annual
summary.

J. Food Prot. 50, 420-428

TURKOVA, J. (1978):

Affinity chromatography

Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford
und New York

VARADARAJ, M.C. und V.K.N. NAMUDRIPAD (1982):

Staphylococcal incidence in market Khoa and their
enterotoxin production.

J. Food Sci. Technol. 19, 53-57

van WEEMEN, B.K. und A.H.W.M. SCHUURS (1971):

Immunoassay using antigen-enzyme conjugates.

FEBS Letters 15, 232-235

WENZEL, K. (1981):

Zur Inaktivierung von Staphylokokken-Rohenterotoxinen durch einige Desinfektionsmittel.

Vet. Med. Diss. München

WIENECKE, A.A. (1974):

Enterotoxin production by strains of Staphylococcus aureus isolated from foods and human beings.

J. Hyg. 73, 255-262

WILSON, M.B. und P. NAKANE (1978):

Recent development in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies.

in: KNAPP, W. et al. (1978): Immunofluorescent and related staining techniques, p. 215-224

Biomedical Press, Elsevier, North Holland

WINDYGA, B. (1978):

Occurrence of enterotoxigenic staphylococci, especially producers of enterotoxins D and E among strains isolated from food.

Acta Alimentaria Polonica IV, 129-132

YAMADA, S. (1977a):

Studies on staphylococcal enterotoxins. I. Purification of staphylococcal enterotoxins A, B, C₂, D, and E.

Bull. Azabu. Vet. Coll. 2, 17-29

YAMADA, S. (1977b):

Studies on staphylococcal enterotoxins. II. Characterisation of staphylococcal toxins and incidence of the toxin-producing strains of the organism.

Bull. Azabu. Vet. Coll. 2, 31-46

YAMADA, S., H. IGARASHI und T. TERAYAMA (1977):

Improved reverse passive hemagglutination for simple and rapid detection of staphylococcal enterotoxins A - E in food.

Microbiol. Immunol. 21, 675-682

ZAADHOF, K.-J. (1978):

Gegenwärtiger Stand des Nachweises von Staphylokokken-Enterotoxinen in Milch und Milchprodukten.

19. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft

ZAADHOF, K.-J. und G. TERPLAN (1983):

Inaktivierung von Staphylokokken-Enterotoxinen - ein Überblick.

Wehrmed. Mschr. 27, 467-473

Herrn Professor Dr. G. Terplan möchte ich abschließend für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. K.-J. Zaadhof für seine stete Hilfsbereitschaft und Beratung bei der Fertigstellung meiner Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben, insbesondere Frau D. Schuller, die bei der Durchführung der praktischen Arbeiten half, möchte ich an dieser Stelle ebenfalls meinen Dank aussprechen.

Herrn Professor Dr. J. Meyer danke ich für seine Unterstützung bei der Beschaffung geeigneter Schafe und deren Unterbringung im Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim.

LEBENS LAUF

Name:	Roland Jung
Geburtsdatum:	26. 02. 1958
Geburtsort:	Herrenberg
Eltern	Magdalena Jung, geb. Lauterer Robert Jung
1965 - 1968	Volksschule Herrenberg
1968 - 1977	Schickhardt-Gymnasium Herrenberg
Mai 1977	Abitur
1977 - 1978	Ableistung des Wehrdienstes
1978 - 1984	Studium der Tiermedizin an der Ludwig- Maximilians-Universität München
Juni 1984	Staatsexamen
September 1984	Approbation als Tierarzt
1984 - 1985	Praxisassistent
1985 - 1988	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch

